

KARINA DA SILVA CHAVES

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E DE SEGURANÇA DE
LACTOBACILLUS spp. ISOLADOS A PARTIR DE RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

KARINA DA SILVA CHAVES

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E DE SEGURANÇA DE
LACTOBACILLUS spp. ISOLADOS A PARTIR DE RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2009.

Prof^a. Regina Célia Santos Mendonça
(Co-Orientadora)

Dr^a. Cláudia Lúcia Oliveira Pinto
(Co-Orientadora)

Prof^a. Edimar Aparecida Filomeno
Fontes

Prof. Mauro Mansur Furtado

Prof^a. Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientadora)

“Uma mente que se abre para uma nova idéia nunca volta para o seu tamanho normal...”

(Albert Einstein)

A Deus, acima de tudo e de todos.

Aos meus pais, Walter e Leila.

Aos meus irmãos, Tiago e Kátia.

Ao meu namorado, Paulo Afonso.

À minha família.

Aos meus amigos.

Dedico!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e por me dar forças nos momentos difíceis desta caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação, pelos vastos ensinamentos transmitidos (pessoais e profissionais), pelo respeito e pela paciência durante todos estes anos, desde a iniciação científica.

Aos meus conselheiros, professora Regina Célia Santos Mendonça e Dr^a. Cláudia Lúcia Oliveira Pinto, pelo apoio e pela compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa durante o período de pós-graduação.

À “família” do Laboratório de Culturas Láticas, que me acolheu como mais um de seus membros. Em especial à Luciana, pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e pela paciência durante todos estes anos; a Flávia, Aline, Vivian Carolina, Milene, Juliana, Fabiana, Tatiane, Joice, Éder, Talita, Ana Carolina Brumano e Célio, pela amizade e convivência.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela amizade.

Aos meus pais, Walter e Leila, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Tiago e Kátia, pelo apoio, pela amizade e pelo alegre convívio.

Ao meu namorado, Paulo Afonso, pelo amor, pelo companheirismo e pelo apoio incondicional.

À minha família, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus amigos, Luiza, André e Mariana, pelos conselhos.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram por mais este êxito, o meu humilde MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

KARINA DA SILVA CHAVES, filha de Walter da Silveira Chaves e de Leila Aparecida da Silva Chaves, nasceu em 22 de setembro de 1984, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em 2003, iniciou o Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em 2006 e 2007, foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Tecnologia de Alimentos, sob a orientação da professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.

Em agosto de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, em nível de mestrado, sob a orientação da professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2009.

CONTEÚDO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1- Introdução	1
2- Revisão bibliográfica	3
2.1 Microbiota intestinal	3
2.2 Probióticos	4
2.3 O gênero <i>Lactobacillus</i>	4
2.4 <i>Lactobacillus</i> : propriedades probióticas em humanos.....	5
2.5 Seleção de microrganismos probióticos.....	6
2.5.1 Aspectos de funcionalidade	6
2.5.1.1 Sobrevivência de bactérias probióticas as barreiras gastrointestinais	6
2.5.1.2 Antagonismo a patógenos.....	7
2.5.2 Aspectos tecnológicos	9
2.5.3 Aspectos de segurança.....	10
2.5.3.1 Suscetibilidade a antibióticos	10
2.5.3.2 Fatores de virulência: atividade gelatinase e hemolítica	11
3- Material e métodos.....	13
3.1 Origem, isolamento e identificação dos isolados de recém-nascidos	13
3.2 Caracterização fenotípica dos isolados.....	14
3.3 Seleção dos isolados resistentes a sais biliares e ao suco gástrico	14
3.3.1 Preparo do inóculo	14
3.3.2 Teste de resistência a sais biliares	15
3.3.3 Teste de resistência ao suco gástrico	15
3.4 Suscetibilidade aos antibióticos	16
3.5 Antagonismo a patógenos	16
3.5.1 Origem, manutenção e ativação dos microrganismos patogênicos indicadores.....	17
3.5.2 Determinação do antagonismo dos <i>Lactobacillus</i> spp. a patógenos por meio da técnica de <i>spot</i>	17
3.5.3 Determinação do antagonismo a patógenos por meio da técnica de difusão em placas.....	17
3.6 Avaliação da capacidade de produção de hemolisina	18
3.7 Avaliação de capacidade de produção de gelatinase	19

4- Resultados e discussão	20
4.1 Identificação fenotípica dos isolados empregando Kit API.....	20
4.2 Resistência a sais biliares	26
4.3 Resistência ao suco gástrico.....	29
4.4 Suscetibilidade a antibióticos	33
4.5 Atividade antagonista dos isolados de <i>Lactobacillus</i> spp. a patógenos	42
4.6 Atividade hemolítica e gelatinase.....	45
5- Conclusões	47
6- Referências bibliográficas	48
APÊNDICE	61

RESUMO

CHAVES, Karina da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. Avaliação de características probióticas e de segurança de *Lactobacillus* spp. isolados a partir de recém-nascidos. Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Orientadoras: Regina Célia Santos Mendonça e Cláudia Lúcia Oliveira Pinto.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam uma longa história quanto ao seu uso seguro em alimentos. No entanto, nos últimos anos, esses microrganismos têm sido relacionados a infecções, o que tem aumentado o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes. Em função da necessidade de disponibilizar isolados bem identificados com características probióticas definidas e seguros para a aplicação na área clínica, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar fenotipicamente *Lactobacillus*, isolados de quatro crianças, e avaliar o potencial probiótico desses microrganismos por meio de alguns aspectos de funcionalidade e segurança, como resistência aos sais biliares e ao suco gástrico, antagonismo a patógenos, suscetibilidade antimicrobiana e atividade de hemolítica e gelatinase. Os 61 isolados selecionados foram identificados como *Lactobacillus rhamnosus* (22), *Lactobacillus brevis* (29), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (1), *Lactobacillus plantarum* (4), *Lactobacillus buchneri* (2) e *Lactobacillus fermentum* (3). Dos 61 isolados, 91,8 % foram resistentes aos sais biliares e 62,3 % apresentaram redução de ciclos logarítmicos menor ou igual a 1, após 90 minutos de incubação em presença do suco gástrico. Em relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, os isolados apresentaram variação na sensibilidade de 1,6 % (ciprofloxacina) a 100 % (cefalexina e meropenem) aos 14 antibióticos avaliados. A atividade antagônica foi avaliada por dois métodos: difusão em placas e *spot*. No método de difusão em placas, o sobrenadante livre de células não promoveu a inibição dos patógenos avaliados. Já no método *spot* os isolados apresentaram variabilidade na atividade antagonística sobre o crescimento dos diferentes patógenos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). A inibição observada foi estirpe dependente e promovida não somente por ácidos orgânicos, uma vez que não foi totalmente revertida quando se utilizou meio tamponado. Nenhum dos isolados foram

gelatinase positiva, no entanto 60 isolados apresentaram atividade hemolítica, tendo 24 isolados apresentaram atividade α -hemólise, 34 β -hemólise e 3 não apresentaram atividade hemolítica (γ - hemólise). Os isolados apresentaram variação quanto às características probióticas e de segurança. Embora os isolados Ufvcc1152, Ufvcc1153 e Ufvcc1155 não tenham apresentado atividade α ou β -hemólise e atividade gelatinase, estes não usufruem de todas as características probióticas avaliadas, sendo a utilização como *pool* a melhor estratégia de aplicação, uma vez que os fenótipos estudados se complementam. Os resultados encontrados não devem ser extrapolados para as bactérias do gênero *Lactobacillus* e para as espécies identificadas, uma vez que as características de funcionalidade, segurança e tecnológica podem ser estirpe dependente. Portanto, cada novo isolado deve ser avaliado para todos os requisitos definidos no relatório da elaboração de diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos (FAO/WHO, 2002), para que o profissional de saúde tenha à sua disposição estirpes bem caracterizadas e seguras.

ABSTRACT

CHAVES, Karina da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2009. Evaluation of probiotic characteristics and safety of *Lactobacillus* spp. isolated from newborns. Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-Advisers: Regina Célia Santos Mendonça e Cláudia Lúcia Oliveira Pinto.

Lactobacillus bacteria present a long history with regard to its safe usage in foods. However, in recent years, these microorganisms have been related to infections which have increased in numbers due to new strains of *Lactobacillus*. With the necessity of making available well identified isolated that present well defined probiotic characteristics and safety in clinical application, this study had the objective of isolating and phenotypically identifying *Lactobacillus* isolated from four infants and evaluate the probiotic potential of these microorganisms by some means of safety and functional aspects, as to resistance to bile salts and gastric juice, antagonism to pathogens, anti-microbial susceptibility and hemolytic and gelatinase activity.

The 61 selected isolated were identified as *Lactobacillus rhamnosus* (22), *Lactobacillus brevis* (29), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (1), *Lactobacillus plantarum* (4), *Lactobacillus buchneri* (2) and *Lactobacillus fermentum* (3). From the 61 isolated, 91.8% were resistant to bile salts and 62.3 % presented a reduction of logarithmic cycles lower than or equal to 1, after 90 minutes of incubation in the presence of gastric juice. In relation to the anti-microbial susceptibility profile, the isolated presented a variation at the sensitivity of 1.6% (ciprofloxacin) at 100 % (cephalexin and meropenem) for the 14 evaluated antibiotics. An antagonistic activity was evaluated by two methods: plaque dissemination and *spot*. In the plaque dissemination method, the cell free supernatant did not promote the inhibition of the evaluated pathogens. As for the *spot* method, the isolated presented variability in the antagonistic activity over the growth of different pathogens, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). The observed inhibition was a dependent strain and was not promoted only by organic acids, since it was not totally reverted when a buffered mean was used. None of the isolated were positive gelatinase, however, 60 isolated presented hemolytic activity, 24 of the isolated presented α -hemolysis, 34 β -hemolysis and 3 didn't present hemolytic activity (γ -hemolysis).The

isolated presented variation concerning probiotic and safety characteristics. Although the isolated, UFVCC1152, UFVCC1153 e UFVCC1155 had not presented α or β -hemolysis and gelatinase activity, they do not fully enjoy all of the evaluated probiotic characteristics, and its usage as a *pool*, was the best applying strategy, once the studied phenotypes complemented themselves. The results should not be extrapolated for the *Lactobacillus* type of bacteria and for the identified species, once the functionality characteristics, safety and technology may be a dependent strain. Therefore, each new isolated must be evaluated for all defined requisites on the guideline elaboration report for the probiotic evaluation on foods (FAO/WHO, 2002), so that health professionals may have well characterized and safe strains at his disposal.

1- Introdução

A pesquisa na área de probióticos tem progredido consideravelmente e avanços significativos foram feitos na seleção e na caracterização de culturas probióticas para uso específico (FAO/WHO, 2002).

Os microrganismos probióticos desempenham importante papel na modulação da microbiota gastrointestinal, conferindo efeitos benéficos locais ou sistêmicos no organismo humano.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

No processo de seleção de um microrganismo probiótico devem ser considerados: i) origem da estirpe; ii) capacidade de aderir à mucosa intestinal; iii) resistência aos sais biliares; iv) resistência ao suco gástrico; v) capacidade de produzir substâncias antimicrobianas; vii) antagonismo a patógenos; viii) histórico de não patogenicidade; ix) ausência de genes de resistência a antibióticos; x) ausência de virulência; xi) incapacidade de produzir metabólitos tóxicos; xii) incapacidade de translocar ou induzir a translocação de microrganismos patogênicos (FAO/WHO, 2002). Além disso, as estirpes não deverão promover alterações no produto e resistirem às condições de processamento, mantendo sua atividade e viabilidade, para que no momento do consumo contenham números altos do microrganismo probiótico (HUIS'T VELD; SHORTT, 1996; FERREIRA, 2003).

As bactérias probióticas geralmente estudadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que apresentam uma longa história de uso seguro em alimentos. Os efeitos benéficos atribuídos a esses gêneros incluem prevenção de inflamações intestinais, diminuição de eczema e diminuição na resposta de hipersensibilidade de substâncias alergênicas em crianças, além da redução dos efeitos em indivíduos lactase não persistentes (ISOLAURI et al., 2000; KALLIOMAKI et al., 2001; GRIFFIN et al., 2002; ISOLAURI et al., 2004; KUKKONEN et al., 2007).

No entanto, nos últimos anos, alguns estudos têm identificado bactérias probióticas do ácido láctico envolvidas em infecções, o que tem aumentado o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes (VESTERLUND et al., 2007). Com base nesta premissa, os objetivos deste estudo foram isolar do mesmo sítio

ecológico estirpes de *Lactobacillus* de origem infantil, que foram submetidas à identificação fenotípica e avaliar o potencial probiótico por meio de alguns aspectos de funcionalidade e segurança, como resistência aos sais biliares e ao suco gástrico, suscetibilidade antimicrobiana, antagonismo ao crescimento de patógenos e atividade da enzima gelatinase e hemolisina.

2- Revisão bibliográfica

2.1 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana começa a ser formada no momento do nascimento, por meio do contato do recém-nascido com o canal vaginal, com a pele da mãe, com as mãos das enfermeiras e com o ar do ambiente (MACKIE et al., 1999; KLINGER et al., 2007). Inicialmente, os neonatos são colonizados por uma grande variedade de bactérias, como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., que possuem o crescimento favorecido no princípio da colonização do trato gastrointestinal em função do potencial de oxirredução positivo no intestino. Posteriormente, com a diminuição do teor de oxigênio, o ambiente torna-se reduzido e propício ao crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, favorecendo a proliferação de bifidobactérias, bacteróides e clostrídios (MACKIE et al., 1999). Após três a quatro dias do nascimento, bactérias do gênero *Bifidobacterium* passam a predominar e as bactérias presentes inicialmente apresentam redução gradual, provavelmente pela redução de nutrientes utilizados em meio com baixo potencial de oxirredução (MITSUOKA, 1978). Embora as bactérias bífidas sejam consideradas os microrganismos mais importantes para lactantes, bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Escherichia coli* encontram-se em alta proporção na microbiota intestinal de crianças e adultos (MITSUOKA, 1996).

Durante o desmame, quando uma dieta de adulto é introduzida na alimentação das crianças, uma microbiota bacilar, Gram negativa, semelhante à de adultos passa a predominar. O número de bifidobactérias diminui sendo ultrapassado por bacteróides, eubactéria e *Peptostreptococci* spp. (MITSUOKA, 1996). Após o primeiro ano de vida, a microbiota torna-se estável, e os gêneros comumente encontrados são: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *E. coli* e *Clostridium* (HOLZAPFEL et al., 1998; SERINO et al., 2009). Com o passar do tempo, na terceira idade, a concentração de bifidobactéria diminui ainda mais e os microrganismos, como *Lactobacillus*, *Streptococci*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridium perfringens*, aumentam significativamente. Alterações na sucessão microbiana ao longo do tempo são influenciadas pela dieta, pela idade, pelo estresse, pelo uso de antibiótico e pelo estado fisiológico do hospedeiro (KLIGLER et al., 2007; SERINO et al., 2009).

2.2 Probióticos

A palavra probiótico deriva do grego e significa “para vida”, sendo o antônimo de antibiótico, “contra vida” (HAMILTON-MILLER et al., 2003). A terminologia probiótico recebeu várias definições, sendo a internacionalmente aceita a de que são microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Os microrganismos mais comumente usados como probióticos são as bactérias do ácido láctico, principalmente as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que fazem parte da microbiota benéfica do intestino delgado e grosso, respectivamente (KOPP-HOOLIHAN, 2001; FERREIRA, 2003).

A pesquisa na área de probióticos tem progredido consideravelmente, em função do aumento do interesse por produtos suplementados com estes microrganismos para manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo o combate à diarreia (ARVOLA et al., 1999), a estimulação do sistema imune (ISOLAURI et al., 2004), a redução de eczema e a hipersensibilidade de substâncias alergênicas em crianças (KALLIOMAKI et al., 2001; KUKKONEN et al., 2007), a prevenção de inflamações intestinais (ISOLAURI et al., 2000, KALLIOMAKI et al., 2001), além de modular os efeitos indesejáveis da lactase não persistentes (GRIFFIN et al., 2002).

2.3 O gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus pertencem ao grupo de bactérias do ácido láctico (BAL), são Gram positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, não esporulam e são fastidiosos. Os lactobacilos são encontrados em uma variedade de habitats, por exemplo, nas membranas mucosas da espécie humana e animal, como cavidade oral, intestino e vagina, em plantas e material orgânico, em habitats artificiais, como esgotos, e em alimentos fermentados ou deteriorados (AXELSSON,1998; BERNARDEAU et al., 2006).

O gênero *Lactobacillus* foi descrito pela primeira vez por Beijerinck, em 1901. As espécies do gênero foram agrupadas com base em características fenotípicas, de acordo com a temperatura ótima de crescimento e a fermentação de hexoses (ORLA-JENSEN,1919), e posteriormente como homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios (KANDLLER e

WEISS, 1986). Lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato. Os heterofermentativos obrigatórios incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo a produção de gás a partir da glicose uma característica marcante dessas bactérias. Os heterofermentativos facultativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses microrganismos também fermentam pentoses, por meio da atividade de uma fosfoacetolase induzida para produzir ácido láctico e acético (VÁSQUES et al., 2005).

O gênero *Lactobacillus* é filogeneticamente diverso. Com o desenvolvimento das técnicas moleculares e caracterização genética, este gênero foi reorganizado, com a identificação de novos grupos, baseando-se na região 16S rRNA (COLLINS et al., 1991).

2.4 *Lactobacillus*: propriedades probióticas em humanos

Os benefícios à saúde humana e animal de bactérias do gênero *Lactobacillus* têm sido relatados em vários estudos. Pesquisas demonstraram a eficiência do uso deste microrganismo na prevenção de distúrbios intestinais (ARVOLA et al., 1999; MACFARLAN; CUMMINGS, 2002; REID; BURTON, 2002), na estimulação do sistema imune (PERDIGON et al., 2001; CROSS, 2002, ISOLAURI et al., 2004), na utilização da lactose por indivíduos lactase não persistentes (GRIFFIN et al., 2002; LEVRI et al., 2005), na redução de inflamações e reações alérgicas (VILJANEN et al., 2005) e na prevenção de câncer de cólon (WOLLOWSKI et al., 2001).

Arvola et al. (1999) demonstraram em crianças um efeito benéfico de *L. rhamnosus* GG (*Lactobacillus* GG; American Type Culture Collection ATCC53103) no combate à diarreia após terapia com antibióticos. O mesmo microrganismo mostrou efeito positivo na redução da incidência de eczema atópico em crianças (KALLIOMÄKI et al., 2003). Rosenfeldt et al. (2002) observaram que as estipes *L. rhamnosus* 19070-2 e *L. reuteri* DSM 12246 foram eficazes na redução da duração de diarreia em pré-escolares.

A terapia de reidratação oral é comumente utilizada em crianças com diarreia aguda. Simakachorn et al. (2000) verificaram que a estirpe de *L. acidophilus* LB, ao

ser adicionada à terapia de reidratação oral, mostrou-se efetiva na redução do tratamento nas crianças.

2.5 Seleção de microrganismos probióticos

No processo de seleção de um microrganismo probiótico os aspectos funcionalidade, segurança e características tecnológicas são importantes requisitos a serem avaliados para indicação em humanos (SAARELA, 2000).

2.5.1 Aspectos de funcionalidade

Dentre os aspectos de funcionalidade o microrganismo deve apresentar: i) capacidade de aderir à mucosa intestinal; ii) resistência aos sais biliares; iii) resistência à lisozima; iv) resistência ao suco gástrico; v) produção de substâncias antimicrobianas; e vi) antagonismo a patógenos (SAARELA, 2000; FAO/WHO, 2002).

2.5.1.1 Sobrevivência de bactérias probióticas as barreiras gastrointestinais

Bactérias probióticas, ao serem ingeridas, devem ser resistentes às enzimas da cavidade oral, como lisozima (FULLER, 1992), à acidez gástrica e à toxicidade à bile (GIBSON e FULLER, 2000).

O baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina representam uma barreira eficaz à entrada de bactérias no trato intestinal. O pH do estômago varia entre 2,5 e 3,5 (HOLZAPFEL et al., 1998). No entanto, não há um padrão à tolerância gástrica no processo de seleção *in vitro*, devendo ser ressaltado que uma escala de pH 1,0 a 5,0 tem sido usada para selecionar lactobacilos, bifidobactérias e algumas estirpes de propionibactérias em relação a essa barreira (CONWAY et al., 1987; LANKAPUTHRA; SHAH, 1995; CHARTERIS et al., 1998; CHOU; WEIMER, 1999; CHUNG et al., 1999; ZARATE et al., 2000).

O tempo de passagem do alimento no estômago pode apresentar duração média de 90 minutos, tendo a natureza do alimento influência no tempo de residência do alimento, podendo variar de 2 a 4 horas (BERADA et al., 1991; SMITH, 1995).

Após resistir ao estresse ácido, as bactérias devem apresentar a capacidade de resistir à toxicidade dos sais biliares.

A resistência das bactérias lácticas aos sais biliares tem sido verificada, sendo sua suscetibilidade testada em meio seletivo contendo diferentes concentrações de bile (GILLILAND et al., 1984; IBRAHIM; BEZKOROVAINY, 1993; CLARK; MARTIN, 1994; CHUNG et al., 1999). Bactérias do gênero *Lactobacillus* isoladas de produtos fermentados e do trato intestinal têm apresentado resistência aos sais biliares. Esta resistência tem sido relacionada à atividade hidrolase aos sais biliares, em que o gene que codifica esta enzima foi caracterizado para *L. johnsonii* 100-100, *L. acidophilus* KS-13 e *L. plantarum* 80 (CHRISTIAENS et al., 1992; HALLER et al., 2001; MOSER; SAVAGE, 2001; ELKINS et al., 2001). Moser e Savage (2001) sugeriram que a atividade hidrolase aos sais biliares de alguns lactobacilos apresenta um nível de importância para a colonização intestinal em humanos.

2.5.1.2 Antagonismo a patógenos

A atividade antagônica contra bactérias patogênicas pode ocorrer por meio da produção de substâncias antimicrobianas ou por exclusão competitiva, em que os microrganismos probióticos competem por sítios de adesão na superfície do epitélio.

A produção de metabólitos, como ácidos orgânicos, incluindo ácido lático e ácido acético, de peróxido de hidrogênio e de bacteriocinas confere efeito protetor ao ambiente intestinal do hospedeiro (JACK et al., 1995).

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos, ribossomicamente sintetizados e secretados por bactérias, sendo ativos contra bactérias patogênicas e deteriorativas (KAISER; MONTVILLE, 1993; KLAENHAMMER, 1993; CLEVELAND et al., 2001). Estudos realizados por diferentes pesquisadores evidenciaram a produção de bacteriocinas por bactérias do gênero *Lactobacillus*, sendo detectada em *L. acidophilus* NCFM (FERREIRA; GILLILAND, 1988), *L. johnsonii* (LEER et al., 1995), *L. salivarius* ssp. *salivarius* (FLYNN et al., 2002), *L. reuteri* (KABUKI et al., 1997) e *L. acidophilus* (MURIANA; KLAENHAMMER, 1991; KANATANI et al., 1995).

As bacteriocinas geralmente são pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos,

ponto isoelétrico elevado e características anfipáticas. Variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas (KAISER; MONTVILLE, 1996; VERHEUL et al., 1997). O modo de ação das bacteriocinas depende da sua concentração, podendo elas apresentar efeito bactericida ou bacteriostático e atuar na permeabilidade da membrana dos microrganismos sensíveis por meio da formação de poros, o que causa um desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato (BRUNO; MONTVILLE, 1994).

Os ácidos orgânicos produzidos durante o metabolismo bacteriano apresentam atividade antagônica. Por serem lipofílicos, em sua forma não dissociada, apresentam capacidade de se difundirem na membrana celular, causando alterações no pH interno. No citoplasma celular, ao sofrerem dissociação, promovem o colapso do gradiente de prótons e a consequente interrupção do sistema de transporte de substrato para a célula, comprometendo as funções metabólicas do microrganismo (MROZ, 2000). Bactérias probióticas do ácido láctico apresentam como produto de seu metabolismo ácidos orgânicos, como ácido láctico e ácido acético, que têm efeito inibitório contra bactérias patogênicas.

Midolo et al. (1995) observaram a inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 pelas estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* subsp. *rammnosus* e *B. bifidus*, pela produção de ácido láctico e acético. Similarmente, Strus et al. (2001) constataram que estirpes de lactobacilos isolados do trato digestivo inibiram o crescimento de *H. pylori*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* e *Clostridium difficile*, que são agentes causadores de infecções gastroentéricas. Wong e Chen (1988) verificaram inibição do crescimento das células vegetativas e 50 % da germinação dos endósporos de *Bacillus cereus* por meio dos ácidos orgânicos produzidos por *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *L. bulgaricus*.

Outro composto antimicrobiano é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzido durante o metabolismo de bactérias do ácido láctico em presença de oxigênio, em função da ação de flavoproteínas oxidases ou peroxidases (NADH) (HOLZAPFEL et al., 1995). Os metabólitos de oxigênio (peróxido de hidrogênio e radicais livres) apresentam efeito bactericida ou bacteriostático em relação aos microrganismos patogênicos e deterioradores. O peróxido de hidrogênio promove a inativação de enzimas, devido à oxidação de grupos sulfidrílicos, altera a permeabilidade da

membrana por meio da peroxidação de lipídeos e danifica a estrutura do DNA bacteriano, pela formação de radicais livres como (O^{2-}) e hidroxil (OH^-), podendo esta alteração ser reversível ou irreversível (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam importante papel no equilíbrio da microbiota vaginal de humanos e animais. Em estudo realizado por Jung et al. (2009) constatou-se que *Lactobacillus* isolados da vagina de humanos apresentaram atividade antagônica *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, devido à produção de peróxido de hidrogênio. Xu et al. (2008) observaram resultados similares ao verificarem que 78 estirpes de *Lactobacillus* isolados de vagina de mulheres chinesas grávidas apresentaram efeito inibitório sobre *Candida albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, por meio da produção de peróxido de hidrogênio.

2.5.2 Aspectos tecnológicos

Os aspectos tecnológicos constituem critérios importantes a serem avaliados, uma vez que as bactérias probióticas presentes no alimento carreador devem resistir às condições de processamento e estocagem, não promovendo alterações na textura e nas características sensoriais do produto, além de manterem-se ativas e viáveis para exercer seus efeitos benéficos no hospedeiro (HUIS'T VELD; SHORTT, 1996; FERREIRA, 2003; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Ainda não há consenso quanto à concentração recomendada de bactérias probióticas no alimento. Pesquisadores relatam que a concentração de células viáveis para que seja observado o efeito benéfico em humanos deve variar de 10^6 a 10^{10} UFC.mL⁻¹ (LEE; SALMINEN, 1995; BERNARDEAU et al., 2005).

Algumas bactérias probióticas, especialmente bactérias bífidas, não crescem bem em leite, resultando em um produto com baixas concentrações de microrganismos viáveis, ou mesmo em perda total da viabilidade após armazenamento prolongado (MASCO et al., 2005; MICANEL et al., 1997; TEMMERMAN et al., 2003; THARMARAJ; SHAH, 2003). Portanto, as características tecnológicas são importantes, uma vez que o microrganismo probiótico deve estar viável no momento do consumo para exercer seu efeito benéfico.

2.5.3 Aspectos de segurança

As bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são comumente usadas como probióticos e apresentam uma longa história de uso seguro (SHORTT, 1999; SAXELIN et al., 2005). No entanto, nos últimos anos a segurança destes microrganismos começou a ser questionada em função de relatos de infecções, como bacteremias (SALMINEN et al., 2004; DE GROOTE et al., 2005), endocardites (MACKAY et al., 1999) e septicemia (CHOMARAT; ESPINOUSE, 1991). Infecções causadas por lactobacilos probióticos são extremamente raras, tendo alguns casos sido relatados em pacientes imunocomprometidos, o que indica que cuidados devem ser tomados na administração de probióticos nesses indivíduos (VESTERLUND et al., 2007). Devido à ocorrência destes casos, a generalização do uso de terapias imunossupressora, bem como a utilização de novas estirpes probióticas sem longa história de uso seguro, aumentou a exigência da avaliação da segurança de probióticos (VESTERLUND et al., 2007).

Aspectos de segurança, como origem da estirpe, por não apresentar histórico de associação com doenças ou distúrbios intestinais, não carrear genes plasmidiais de resistência a antibióticos, não promover a degradação de muco intestinal, não translocar ou induzir translocação de microrganismos patogênicos para sítios extra-intestinais e ausência de fatores de patogenicidade, como a produção de hemolisina e gelatinase, devem ser avaliados (SAARELA, 2000; FAO/WHO, 2002).

2.5.3.1 Suscetibilidade a antibióticos

A suscetibilidade antimicrobiana de novos isolados visa prevenir a indicação de estirpes resistentes a antibióticos e a possibilidade de disseminação dessa resistência para microrganismos patogênicos no trato intestinal do hospedeiro comensal (AUSTIN et al., 1999; ROBREDO et al., 2000).

Desde que os antibióticos foram introduzidos no tratamento de doenças microbianas, seu uso tem se tornando cada vez mais difícil, em função da resistência antimicrobiana de bactérias patogênicas (MATHUR; SINGH, 2005). O mecanismo de resistência a antibióticos é fundamentado em quatro estratégias: i) inativação da droga; ii) prevenção de que a droga alcance seu alvo; iii) redução da suscetibilidade ao alvo; ou iv) aquisição de novos mecanismos de resistência. A resistência pode ocorrer por mutações e por aquisição de determinantes de

resistência, que pode ser transferida entre bactérias de uma mesma espécie ou gênero e entre bactérias de espécies ou gêneros diferentes, podendo ser intrínseca ou adquirida ou por pressão seletiva, em função do aumento das concentrações dos antibióticos (BERGER-BÄCHI, 2002; MATHUR; SINGH, 2005).

A resistência intrínseca, ou natural, é cromossomal e não pode ser transferida para outras espécies, podendo estar presente em todas as estirpes de um gênero ou espécie. Já a resistência adquirida pode ocorrer em função da ocorrência de mutações genéticas ou aquisição de uma resistência exógena de outra bactéria por meio da transferência horizontal de genes, podendo este gene ser retransferível (COURVALIN, 2006 a). Como exemplo pode-se citar a resistência à vancomicina de algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus faecium*. Certas espécies de *Lactobacillus* apresentam uma parede de peptidoglicano insensível à ação de vancomicina. Já *E. faecium*, normalmente, é suscetível à vancomicina, e sua resistência é adquirida mediante transferência de plasmídeos (DANIELSEN; WIND, 2003, COURVALIN, 2006 b). Portanto, torna-se cada vez mais importante a realização do teste de suscetibilidade a antibióticos para evitar a entrada de microrganismos resistentes na cadeia alimentar.

2.5.3.2 Fatores de virulência: atividade gelatinase e hemolítica

Fatores de virulência, como atividade hemolítica e gelatinase, são mecanismos comuns entre vários microrganismos patogênicos. A produção de hemolisina ocorre devido ao requerimento de íons ferro, uma vez que este é um micronutriente requerido para o crescimento dos microrganismos patogênicos, devido à sua participação como cofator de várias enzimas (HUSAIN, 2008). As bactérias do ácido lático são relatadas como uma exceção entre os organismos vivos, por não apresentarem requerimento de ferro para crescerem, sendo esta considerada uma vantagem ecológica no ambiente natural, onde competem com bactérias patogênicas (ELLI et al., 2000).

A gelatinase é uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, onde essas proteinases encontram-se associadas com inflamações e virulências em humanos e animais (KANEMITSU et al., 2001).

Estudos realizados por Baumgartner et al. (1998) e Maragkoudakis et al. (2006), constatou-se que algumas das estirpes de lactobacilos avaliadas apresentaram atividade hemolítica, mostrando assim a importância de verificar as características de segurança dos microrganismos probióticos em novas estirpes.

3- Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

3.1 Origem, isolamento e identificação dos isolados de recém-nascidos

O isolamento foi realizado a partir de fezes de quatro recém nascidos alimentados exclusivamente com leite materno, com as seguintes características:

Amostra A: sexo feminino, nascida de parto normal, 23 dias de idade.

Amostra B: sexo feminino, nascida de parto normal, 7 dias de idade.

Amostra C: sexo feminino, nascida de cesariana, 7 dias de idade.

Amostra D: sexo masculino, nascido de parto normal, 7 dias de idade.

O material foi coletado nas fraldas (fezes recém-emitidas), transportado para o laboratório e, então, pesado. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para 99 mL de solução tampão com baixo potencial de oxirredução (KH_2PO_4 : 4,5 g L⁻¹, Na_2HPO_4 : 6,0 g L⁻¹, L-cisteína HCl. H_2O : 0,5 g L⁻¹, Tween 80: 0,5 g L⁻¹, ágar: 1,0 g L⁻¹, pH 6,8), segundo Mitsuoka (1989).

Seguiram-se sequências de diluições decimais com plaqueamento em profundidade das amostras em ágar Rogosa (ROGOSA et al., 1951). As amostras foram incubadas em jarras de anaerobiose (GasPaK, BBL) contendo geradores de CO_2 e H_2 (Anaerobac, Probac), por um período de dois a três dias, a 37 °C, até que colônias fossem formadas. Nas diferentes diluições (10^{-3} a 10^{-7}), foi isolada de cada amostra a raiz quadrada do número de colônias típicas nas placas que apresentaram contagens. Os isolados das diferentes amostras foram transferidos para caldo MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) e cultivados a 37 °C, por 24 a 48 horas. Após o crescimento, empregou-se o método de esgotamento do inóculo em superfície de ágar MRS, seguindo-se a incubação a 37 °C, por 48 horas, em anaerobiose. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase, de acordo com a metodologia descrita por Holdeman et al. (1987). As colônias que apresentaram morfologia bacilar, Gram positivas e catalase negativas,

foram mantidas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, em caldo MRS com 50 % (v/v) de glicerol. Antes de cada análise, os isolados foram ativados três vezes consecutivas em caldo MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) estéril e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 horas.

Os isolados foram identificados fenotipicamente por meio do Kit API CHL e seu potencial probiótico foi avaliado por meio dos testes de resistência aos sais biliares e ao suco gástrico, de atividade antagônica a patógenos, de suscetibilidade a antibióticos, de atividade de hemolisina e de produção de gelatinase.

3.2 Caracterização fenotípica dos isolados

Os isolados foram ativados por três vezes consecutivas em caldo MRS, sendo a última ativação feita em volumes de 20 mL. Após o crescimento, cada cultura foi transferida para tubos de centrifuga de polipropileno (50 mL), com tampas rosqueáveis, Nalgene, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação de $2.750 \times g$ por 15 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em centrífuga de Beckman GS – 6R.

Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o concentrado de células em 5 mL de tampão fosfato (pH 7,2) estéril, para lavagem das células, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o concentrado foi ressuspendido em 2 mL do mesmo tampão, tendo sido utilizado como inóculo para a caracterização em Kits API CHL (BioMerieux - SA, *Marcy L'Etoile, France*), conforme descrição do fabricante.

Os resultados foram interpretados com o auxílio do programa do Kit API CHL (BioMerieux - SA, *Marcy L'Etoile, France*).

3.3 Seleção dos isolados resistentes a sais biliares e ao suco gástrico

3.3.1 Preparo do inóculo

As culturas puras de cada isolado foram ativadas por três vezes em caldo MRS, sendo a última ativação feita em um volume de 20 mL. Após o crescimento, cada cultura foi transferida para tubos de centrifuga de polipropileno (50 mL), com tampas rosqueáveis, Nalgene, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação de $2.750 \times g$ por 15 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em centrífuga de Beckman GS – 6R.

Após o descarte do sobrenadante, o concentrado de células foi ressuspendido em 2 mL de caldo MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960).

O concentrado celular foi ajustado, adicionando-se gotas do mesmo em tubos contendo 5 mL de caldo MRS (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960), esterilizado, até obter densidade ótica de $0,90 \pm 0,2$ em espectrofotômetro (SPECTRONIC 20 D+, USA), a 600 nm. O concentrado de células padronizado de cada cultura foi utilizado nos testes de resistência a sais biliares e ao suco gástrico (TESHIMA, 2001).

3.3.2 Teste de resistência a sais biliares

Inoculou-se 5 % do concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) em tubos contendo 5 mL de caldo MRS, adicionado ou não (controle) de 0,3% de Oxgall (DIFCO®, USA).

Os tubos foram mantidos a 37 °C e o crescimento foi avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de 2 horas, durante 6 horas de incubação (GILLILAND et al., 1984). A análise foi repetida duas vezes.

Segundo Gilliland et al. (1984), uma bactéria, para ser considerada resistente aos sais biliares, deve apresentar densidade ótica maior ou igual a 0,3 (600 nm), após 6 horas de incubação na presença de 0,3 % de sais biliares (oxgall).

3.3.3 Teste de resistência ao suco gástrico

O concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) de cada cultura foi inoculado (5 %) em 10 mL de suco gástrico artificial (cloreto de sódio: 2,0 g; pepsina: 3,2 g; ácido clorídrico concentrado: 7,0 mL; água destilada: 1000 mL; e pH final de 2,0), de acordo com *Gastric Juice* (1980). A solução de suco gástrico foi esterilizada a frio (membranas de Millipore de 0,45 µm). As amostras de suco gástrico inoculadas foram mantidas a 37 °C, e a contagem de células viáveis foram realizadas imediatamente a 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a inoculação, em ágar MRS (NEUMANN; FERREIRA, 1995). O número de microrganismos no tempo zero foi similar para todos os isolados, aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹. A análise foi repetida duas vezes.

3.4 Suscetibilidade aos antibióticos

Utilizou-se o método da difusão em placa (BAWER, 1966) com discos impregnados com os antibióticos: amicacina (10 µg), ampicilina (30 µg), cefalexina (30 µg), vancomicina (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefalotina (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfonamidas (300 µg), penicilina (10 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e amoxicilina (10 µg). Os discos foram obtidos do laboratório SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

Os isolados previamente ativados foram distribuídos (0,1 mL) em placas de Petri contendo ágar MRS, empregando-se técnica de espalhamento em superfície. Utilizou-se uma suspensão de 10^8 UFC mL⁻¹ como inóculo (LEHTO; SALMINEN, 1997). O ágar MRS foi utilizado, substituindo o ágar Mueller-Hinton devido à alta exigência nutricional do gênero *Lactobacillus*. Os discos contendo os antibióticos foram adicionados às placas em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça estéril. Após 1 hora sob temperatura ambiente as placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas, em câmara de anaerobiose (*Anaerobac work station, Bug Box, Leeds, UK*), utilizando-se mistura anaeróbica (hidrogênio 10 %, dióxido de carbono 5 %, nitrogênio, 85 %). Os halos de inibição foram medidos nas três repetições. Os resultados médios foram avaliados de acordo com a tabela-padrão (SENSIFAR®). A escolha dos antibióticos utilizados nesta experimentação teve como base a frequência de uso nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatais da cidade de Viçosa-MG.

3.5 Antagonismo a patógenos

Neste estudo foram utilizadas duas técnicas para verificação da atividade antagonista dos isolados de *Lactobacillus* spp. sobre o crescimento de microrganismos patogênicos: teste *spot* (FLEMING, 1975) e difusão em placas (*Well diffusion assay*) (TAGG et al., 1976).

No método *spot* verifica-se o antagonismo de células viáveis e no método de difusão em placas a inibição do microrganismo indicador é promovida pela presença de compostos inibitórios no sobrenadante livre de células.

3.5.1 Origem, manutenção e ativação dos microrganismos patogênicos indicadores

Os microrganismos patogênicos indicadores utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), cedidos pelo Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos (UFV). Os isolados foram mantidos sob congelamento a -80 °C, em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Difco*[®], USA), adicionados de solução de glicerol 20 % (v/v).

Antes das análises as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1 %) por três vezes consecutivas, nos meios BHI, e incubadas a 37 °C em aerobiose por 18 a 24 horas.

3.5.2 Determinação do antagonismo dos *Lactobacillus* spp. a patógenos por meio da técnica de *spot*

Os isolados de *Lactobacillus* spp., previamente ativos em caldo MRS, foram inoculados com o auxílio de uma agulha de repicagem descartável estéril para placas de Petri contendo 20 mL de ágar MRS (1,5%). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, sob condições de anaerobiose. Após formação de colônias visíveis, 10 mL de ágar semissólido BHI (0,7%), contendo 10^6 UFC mL⁻¹ da estirpe patogênica indicadora, foram vertidos sobre a placa. Estas foram mantidas sob refrigeração por 12 horas e posteriormente incubadas a 37 °C por 48 horas (FLEMING, 1975).

A atividade antagonista foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor das colônias.

Para verificar se o antagonismo era promovido por ácidos orgânicos, o mesmo teste *spot* foi realizado em meio ágar MRS tamponado com 2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (TOURÉ et al., 2003).

3.5.3 Determinação do antagonismo a patógenos por meio da técnica de difusão em placas

Alíquotas de 0,2 mL de cada isolado, previamente ativo, foram transferidas para 20 mL de caldo MRS, seguindo-se a incubação a 37 °C, por 24 horas. Após crescimento, transferiu-se o conteúdo para tubos de centrifuga com capacidade de

50 mL, com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação a $2.750 \times g$ por 20 minutos, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em centrífuga Beckman GS-6R. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana Millipore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e mantido sob refrigeração até o momento de uso.

Orifícios de 7 mm foram feitos em ágar BHI (1,5 %), inoculado com 10^6 UFC mL^{-1} do patógeno indicador. Posteriormente, $30 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante livre de células foram adicionados em cada orifício. As placas foram mantidas sob refrigeração por 12 horas e posteriormente incubadas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. A atividade antagonista foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor dos orifícios (TAGG et al., 1976).

3.6 Avaliação da capacidade de produção de hemolisina

A atividade hemolítica foi avaliada pelo método Baumgartner et al. (1998) adaptado, em que as estirpes foram estriadas em ágar MRS suplementado com 5 % de sangue de carneiro. Os resultados foram avaliados após incubação a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas, sob condição de anaerobiose. A reação hemolítica foi verificada pela formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), pela formação de pigmento verde ao redor da colônia (α - hemólise) e pela ausência de reação (γ - hemólise) (Figura 1). *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi utilizado como controle positivo.



Figura 1: Foto ilustrativa da atividade α - hemólise, β - hemólise e γ - hemólise.

3.7 Avaliação de capacidade de produção de gelatinase

A presença de atividade da enzima gelatinase foi avaliada, modificando-se a metodologia de Su et al. (1991), em que as estirpes foram estriadas em ágar MRS suplementado com 3 % de gelatina. Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C, por 48 horas. A produção desta enzima foi verificada por meio da formação de halo turvo ao redor das colônias. Para determinar se a gelatina no ágar foi realmente hidrolisada, 0,5 a 1,0 mL de solução de Frazier (cloreto mercúrio, 15,0 g; concentrado ácido clorídrico, 20 mL; e água destilada, 100 mL) foi vertido na superfície do meio para precipitar a gelatina não hidrolisada, deixando um halo transparente ao redor das colônias.

4- Resultados e discussão

4.1 Identificação fenotípica dos isolados empregando Kit API

Foram obtidos 249 isolados a partir de fezes de quatro crianças recém-nascidas, caracterizadas como amostras A, B, C e D. A seleção destes foi realizada por meio dos testes de catalase e Gram. Os isolados que apresentaram morfologia de bacilos ou cocobacilos, Gram positivos e catalase negativos foram selecionados, totalizando 61 isolados, sendo 22 isolados da amostra A, 1 isolado da amostra B, 5 isolados da amostra C e 33 isolados da amostra D (Tabela 1).

Tabela 1- Características dos isolados das amostras A, B, C e D quanto à morfologia, coloração de Gram e presença ou ausência de catalase

Amostra	Total de isolados	Bacilos, Gram positivos e catalase negativos
A	24	22
B	60	1
C	91	5
D	74	33
Σ	249	61

Os 61 isolados que apresentaram essas características fenotípicas foram identificados por meio do Kit API.

De acordo com a Tabela 2, ao comparar o perfil de fermentação dos 22 isolados da amostra A, observou-se que todos eram bem semelhantes, sendo estes identificados como *L. rhamnosus*. O isolado da amostra B foi identificado como *L. paracasei* ssp. *paracasei* (Tabela 3).

Em relação à amostra C observou-se variação no perfil de fermentação, sendo identificadas duas espécies distintas; três dos isolados foram identificados como *L. plantarum* e dois como *L. brevis* (Tabela 4). Nos isolados da amostra D foram identificadas quatro espécies, havendo a predominância da espécie de *L. brevis*; 27 isolados foram identificados como pertencentes a essa espécie. Dentre os demais isolados, dois foram identificados como *L. buchneri*, três como *L. fermentum* e um como *L. plantarum* (Tabela 4).

Tabela 2- Perfil de fermentação de carboidratos e porcentual de confiabilidade de identificação dos 22 isolados da amostra A, de acordo com o Kit API CHL (BioMerieux - SA, Marcy L'Etoile, France)

Isolados	Carboidratos ^a																				Identificação	% de confiabilidade de identificação	
	A M Y A	D A R A	L A R A	C E L	E S C	G A L	G L U	G N T	L A C	M A L	M A N	M L Z	M E L	R A F	R H A	R I B	S A L	S O R	S A C	T R E			D X Y L
UFVCC1179	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1180	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1181	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	93,7
UFVCC1182	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1183	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1184	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1185	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1186	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1187	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1188	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1189	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1190	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1191	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1192	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1193	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	86,5
UFVCC1194	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	86,5
UFVCC1195	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1196	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2
UFVCC1197	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	86,5
UFVCC1198	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	86,5
UFVCC1199	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	86,5
UFVCC1200	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69,2

^aAMY: amigdalina; DARA: D-arabinose; LARA: L- arabinose; CEL: celobiose; ESC: esculina ; GAL: galactose; GLU: glicose; GNT: gluconato ; LAC: lactose; MAL: maltose; MAN: manose; MLZ: melezitose; MEL: melibiose; RAF: rafinose; RHA: ramnose; RIB: ribose; SAL: salicina; SOR: sorbitol; SAC: sacarose; TRE: trealose; DXYL: D-xilose; LXYL: L- xilose.

+ : reação positiva; - : reação negativa.

Tabela 3- Perfil de fermentação de carboidratos e porcentual de confiabilidade de identificação de um isolado da amostra B, de acordo com o Kit API CHL (BioMerieux - SA, Marcy L'Etoile, France)

Isolado	Carboidratos ^a																				Identificação	% de confiabilidade de identificação		
	A M Y A	D A R A	L A R A	C E L L	E S C L	G A L L	G L U L	G N T L	L A C L	M A L L	M A N L	M L Z L	M E L L	R A F L	R H A L	R I B L	S A L L	S O R L	S A C L	T R E L			D X Y L	L X Y L
UFVCC1178	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	93,1

^aAMY: amigdalina; DARA: D-arabinose; LARA: L- arabinose; CEL: celobiose; ESC: esculina ; GAL: galactose; GLU: glicose; GNT: gluconato ; LAC: lactose; MAL: maltose; MAN: manose; MLZ: melezitose; MEL: melibiose; RAF: rafinose; RHA: ramnose; RIB: ribose; SAL: salicina; SOR: sorbitol; SAC: sacarose; TRE: trealose; DXYL: D-xilose; LXYL: L- xilose.

+ : reação positiva; - : reação negativa.

Tabela 4- Perfil de fermentação de carboidratos e porcentual de confiabilidade de identificação dos cinco isolados da amostra C, de acordo com o Kit API CHL (BioMerieux - SA, Marcy L'Etoile, France)

Isolados	Carboidratos ^a																				Identificação	% de confiabilidade de identificação		
	A M Y	D A R	L A R	C E L	E S C	G A L	G L U	G N T	L A C	M A L	M A N	M L Z	M E L	R A F	R H A	R I B	S A L	S O R	S A C	T R E			D X Y	L X Y
UFVCC1168	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	nd*
UFVCC1169	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,6
UFVCC1170	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	53,9
UFVCC1171	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	53,9
UFVCC1172	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	53,9

^aAMY: amigdalina; DARA: D-arabinose; LARA: L- arabinose; CEL: celobiose; ESC: esculina ; GAL: galactose; GLU: glicose; GNT: gluconato ; LAC: lactose; MAL: maltose; MAN: manose; MLZ: melezitose; MEL: melibiose; RAF: rafinose; RHA: ramnose; RIB: ribose; SAL: salicina; SOR: sorbitol; SAC: sacarose; TRE: trealose; DXYL: D-xilose; LXYL: L- xilose.

+ : reação positiva , - : reação negativa; *nd: não determinado.

Tabela 5- Perfil de fermentação de carboidratos e porcentual de confiabilidade de identificação dos 33 isolados da amostra D, de acordo com o Kit API CHL (BioMerieux - SA, Marcy L'Etoile, France)

Isolados	Carboidratos ^a																	Identificação	% de confiabilidade de identificação					
	A M Y A	D A R A	L A R A	C E L L	E S L L	G A L U	G L U	G L U	L A R	M A L	M A L	M A L	M A L	R E F	R E F	R E F	S E R			S E R	S E R	T R E	D E L	L E U
UFVCC1135	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1136	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	nd*
UFVCC1137	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	77,7
UFVCC1138	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nd*
UFVCC1139	-	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1140	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus buchneri</i>	50,4
UFVCC1141	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1142	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1143	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1
UFVCC1144	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,8
UFVCC1145	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus fermentum</i>	79,2
UFVCC1146	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1147	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1
UFVCC1148	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1149	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1
UFVCC1150	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1

(Continua ...)

Tabela 5 (continuação)- Perfil de fermentação de carboidratos e porcentual de confiabilidade de identificação dos 33 isolados da amostra D, de acordo com o Kit API CHL (BioMerieux - SA, Marcy L'Etoile, France)

Isolados	Carboidratos ^a																			Identificação	% de confiabilidade de identificação		
	A M Y A	D A R A	L A R A	C E L C	E S C L	G A L U	G L U T	G N T C	L A C L	M A N Z	M L Z	M E L L	M E L L	R A F L	R H A B	R I B L	S A L R	S O R C	S A C E			T R E Y	D X Y L
UFVCC1153	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1154	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	94,5
UFVCC1155	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,9
UFVCC1156	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1
UFVCC1157	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	65,1
UFVCC1158	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	53,6
UFVCC1159	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	50,8
UFVCC1160	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	74,0
UFVCC1161	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,9
UFVCC1162	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1163	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,9
UFVCC1164	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1165	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5
UFVCC1166	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	nd*
UFVCC1167	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99,5

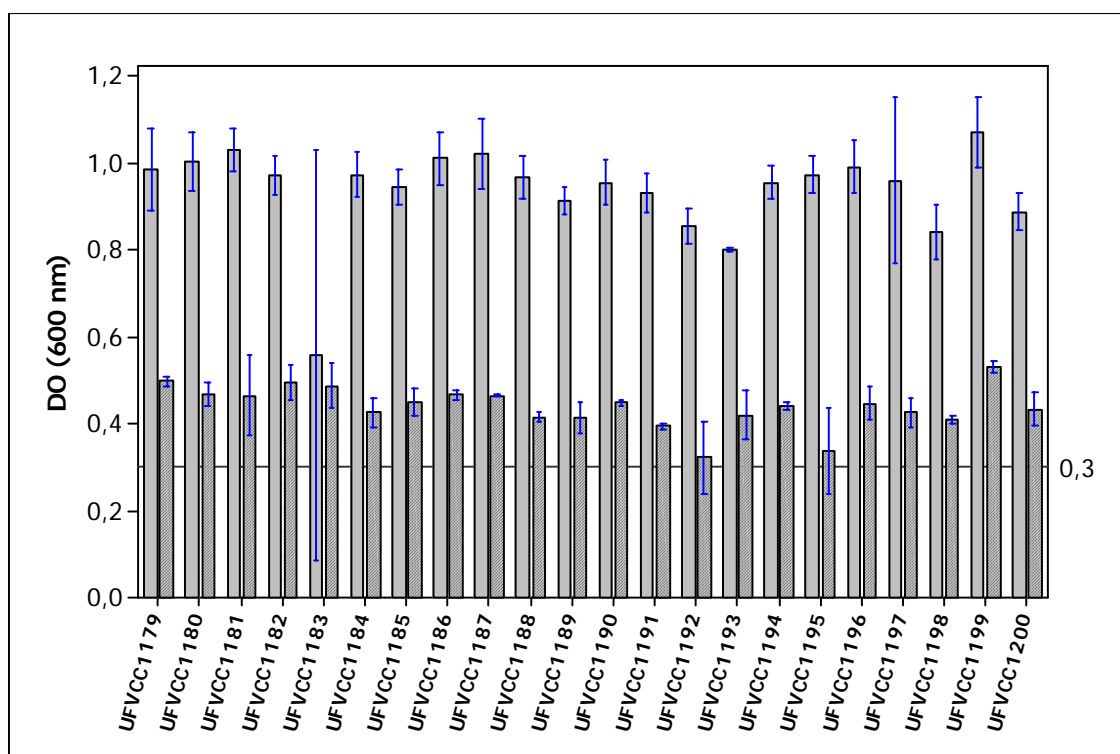
^aAMY: amigdalina; DARA: D-arabinose; LARA: L- arabinose; CEL: celobiose; ESC: esculina ; GAL: galactose; GLU: glicose; GNT: gluconato ; LAC: lactose; MAL: maltose; MAN: manose; MLZ: melezitose; MEL: melibiose; RAF: rafinose; RHA: ramnose; RIB: ribose; SAL: salicina; SOR: sorbitol; SAC: sacarose; TRE: trealose; DXYL: D-xilose; LXYL: L- xilose.

+ : reação positiva; - : reação negativa; *nd: não determinado.

4.2 Resistência a sais biliares

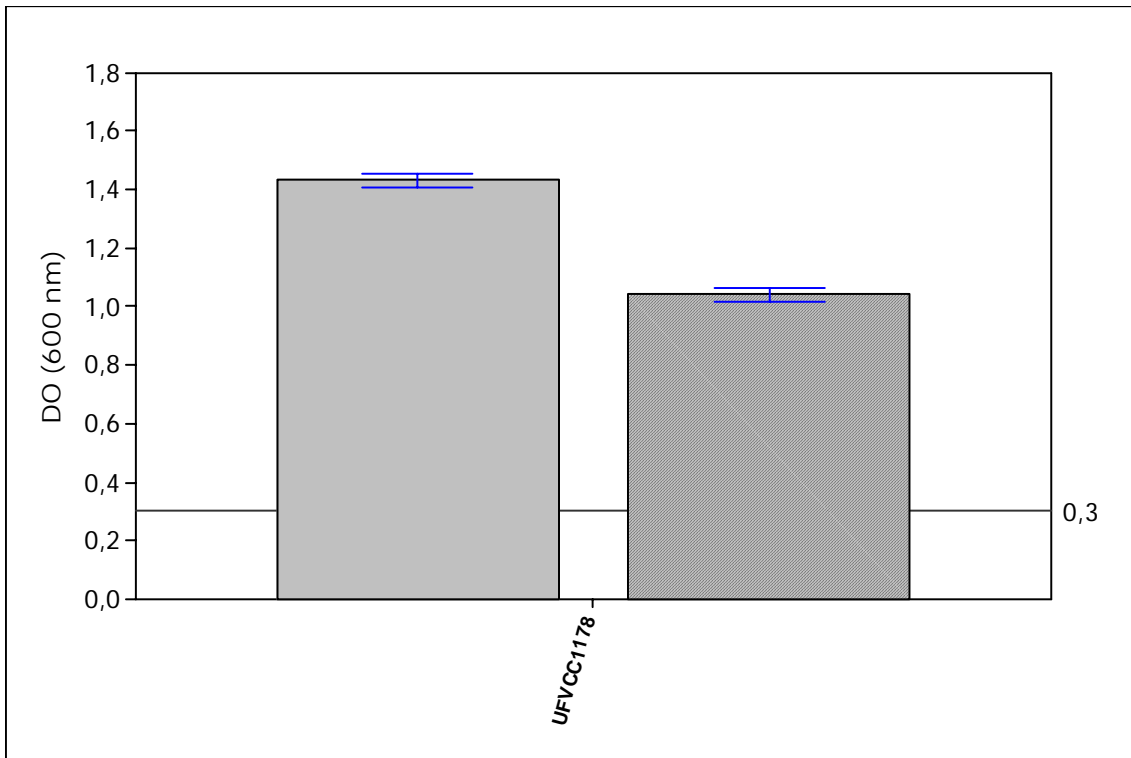
O perfil de resistência aos sais biliares dos isolados, das amostras A, B, C e D, está representado nas Figuras de 2 a 5.

Dentre os 61 isolados, observou-se que os 22 da amostra A, o isolado da amostra B, 4 da amostra C e 29 da amostra D foram resistentes aos sais biliares. A concentração de sais biliares usada no teste corresponde àquela normalmente encontrada na espécie humana e animal.



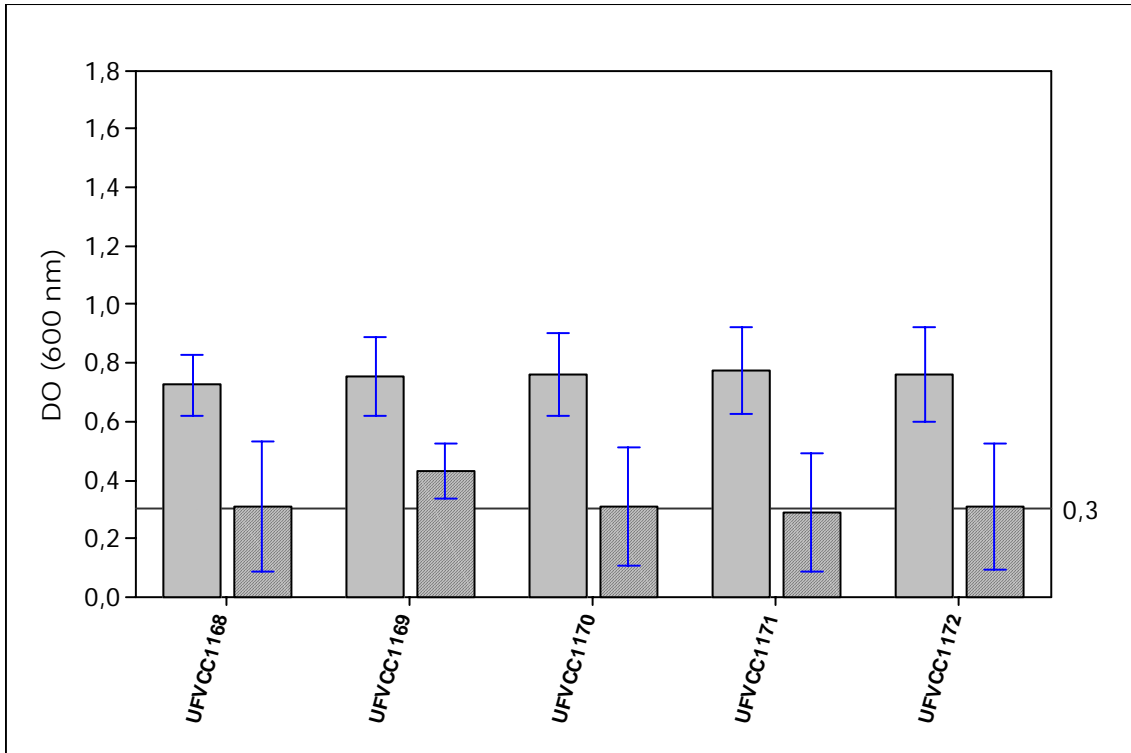
Legenda: □ controle; ▨ oxgall; — ponto de corte: resistência/ sensibilidade.

Figura 2- Resistência aos sais biliares dos 22 isolados (amostra A), após 6 horas de crescimento em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3 % de sais biliares (oxgall) a 600 nm.



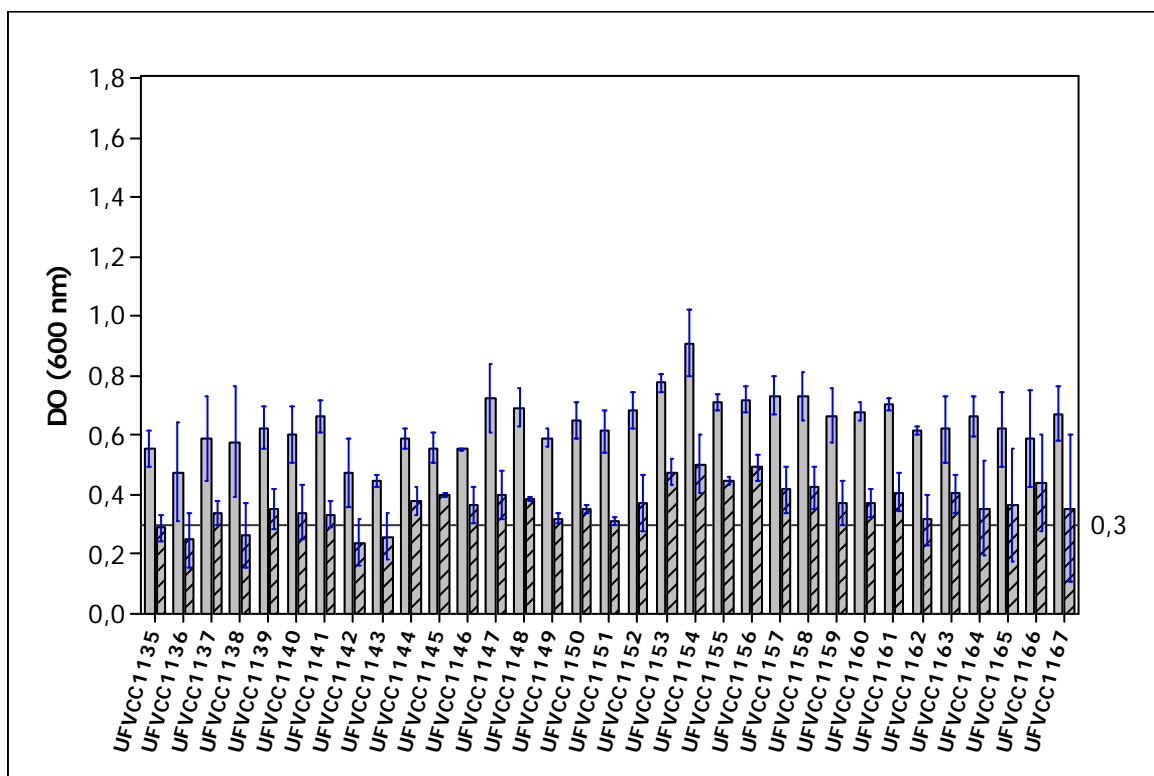
Legenda: □ controle; ▨ oxgall; — ponto de corte: resistência/ sensibilidade.

Figura 3- Resistência aos sais biliares do isolado (amostra B) após 6 horas de crescimento em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares (oxgall) a 600 nm.



Legenda: □ controle; ▨ oxgall; — ponto de corte: resistência/ sensibilidade.

Figura 4- Resistência aos sais biliares dos cinco isolados (amostra C) após 6 horas de crescimento em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares (oxgall) a 600 nm.



Legenda: □ controle; ▨ oxgall; — ponto de corte: resistência/ sensibilidade.

Figura 5- Resistência aos sais biliares dos 33 isolados (amostra D) após 6 horas de crescimento em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares (oxgall) a 600 nm.

A resistência à bile é uma importante característica, pois permite a sobrevivência e o crescimento de lactobacilos no trato intestinal (GILLILAND et al., 1984). Em geral, essa resistência é o resultado da atividade da enzima hidrolase, *bile salt hydrolase* (BSH), sobre os sais biliares, reduzindo o efeito tóxico (DU TOIT et al., 1998).

Coeuret et al. (2004) observaram que 38,7 % dos lactobacilos isolados de leite cru resistiram a 0,3 % de oxgall após 3 horas de incubação. Kheadr (2006) verificou o perfil de resistência de 13 estirpes de *Lactobacillus* em diferentes concentrações de oxgall, 0,1 a 0,5 %, após 24 horas a 650 nm. Apenas as estirpes *L. acidophilus* R052 e *L. plantarum* P/N 601383 foram sensíveis na presença de 0,4% de oxgall. As demais estirpes apresentaram-se resistentes a 0,5 % de oxgall. Em estudo semelhante, Neumann e Ferreira (1995) observaram que as estirpes de *L. acidophilus* NCFM-R₁, *L. acidophilus* NCFM-R₂ e *L. acidophilus* NCFM-S foram sensíveis a 0,3% de oxgall, não atingindo 0,3 de absorbância (620 nm) após 6 horas de incubação a 37 °C.

A resistência aos sais biliares constitui uma importante característica fisiológica a ser avaliada, uma vez que as estirpes devem estar viáveis ao alcançarem o intestino delgado. Entre as 61 estirpes, 91,8 % apresentaram resistência aos sais biliares, indicando seu potencial para uso como probiótico.

4.3 Resistência ao suco gástrico

Dentre os 61 isolados, 23 apresentaram baixo número de células viáveis após 90 minutos em suco gástrico artificial, em pH 2, e 38 isolados apresentaram uma pequena variação no número de células viáveis, comparado com a concentração inicial de células, 10^7 UFC mL⁻¹ (Tabela 5). A avaliação da resistência ao suco gástrico é comumente realizada pela incubação dos isolados por um período de 180 minutos (NEUMANN; FERRERIA,1995; CHARTERIS et al., 1998; VINDEROLA; REINHEIMER, 2003). No entanto, neste estudo o tempo máximo avaliado foi de 90 minutos, em função da baixa viabilidade observada nas primeiras amostras avaliadas.

Tabela 5- Número de células viáveis (log UFC mL⁻¹) após 90 minutos de incubação em presença de suco gástrico artificial a 37 °C.

Número de células viáveis (log UFC mL ⁻¹) após 90 minutos	Número de isolados
> 7	18
6-7	20
5-6	0
4-5	0
3-4	0
2-3	0
1-2	1
< 1	22
Σ	61

A sobrevivência dos 61 isolados das amostras A, B, C e D em suco gástrico artificial, em pH 2, após 90 minutos, está representada nas Figuras de 6 a 8, respectivamente.

Os 61 isolados apresentaram variação quanto à resistência ao suco gástrico artificial (pH 2). Os isolados da amostra A, apesar de terem resistido aos sais biliares, não foram resistentes ao suco gástrico; 16 destes não apresentaram células viáveis após 90 minutos de contato com suco gástrico artificial (Figura 6). O isolado

da amostra B apresentou redução de aproximadamente 5 ciclos log. Na amostra C, houve pequena variação no número de células viáveis, comparado à concentração inicial de 10^7 UFC mL⁻¹. Os isolados da amostra D mantiveram as concentrações iniciais aproximadas de 10^7 UFC mL⁻¹ após 90 minutos de incubação.

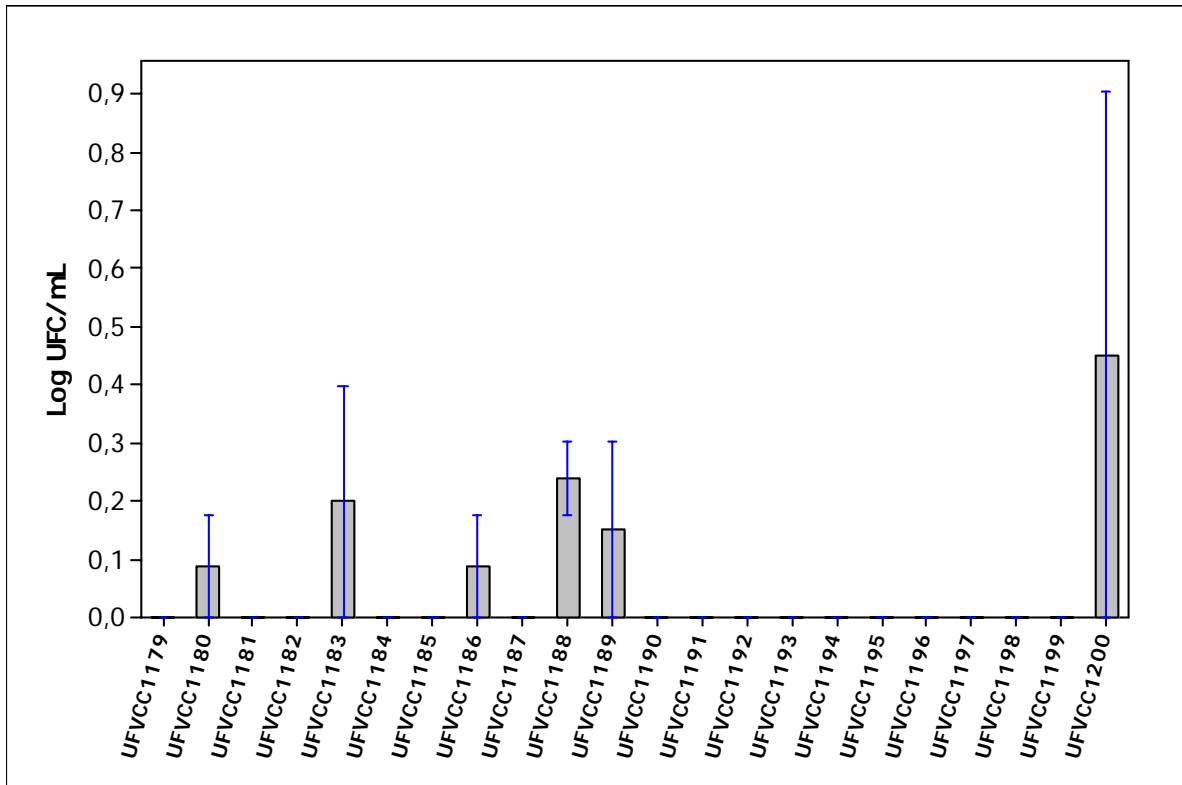


Figura 6- Sobrevivência dos isolados da amostra A ao suco gástrico artificial (pH 2), após 90 minutos.

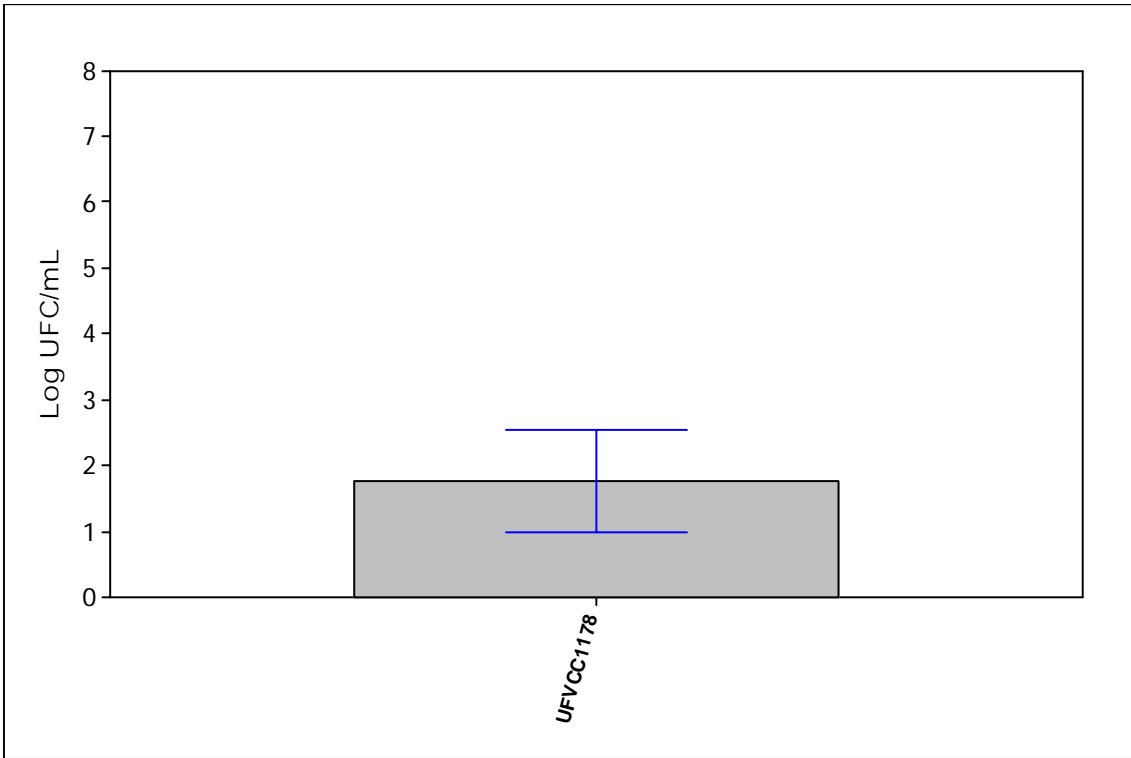


Figura 7- Sobrevivência dos isolados da amostra B ao suco gástrico artificial (pH 2), após 90 minutos.

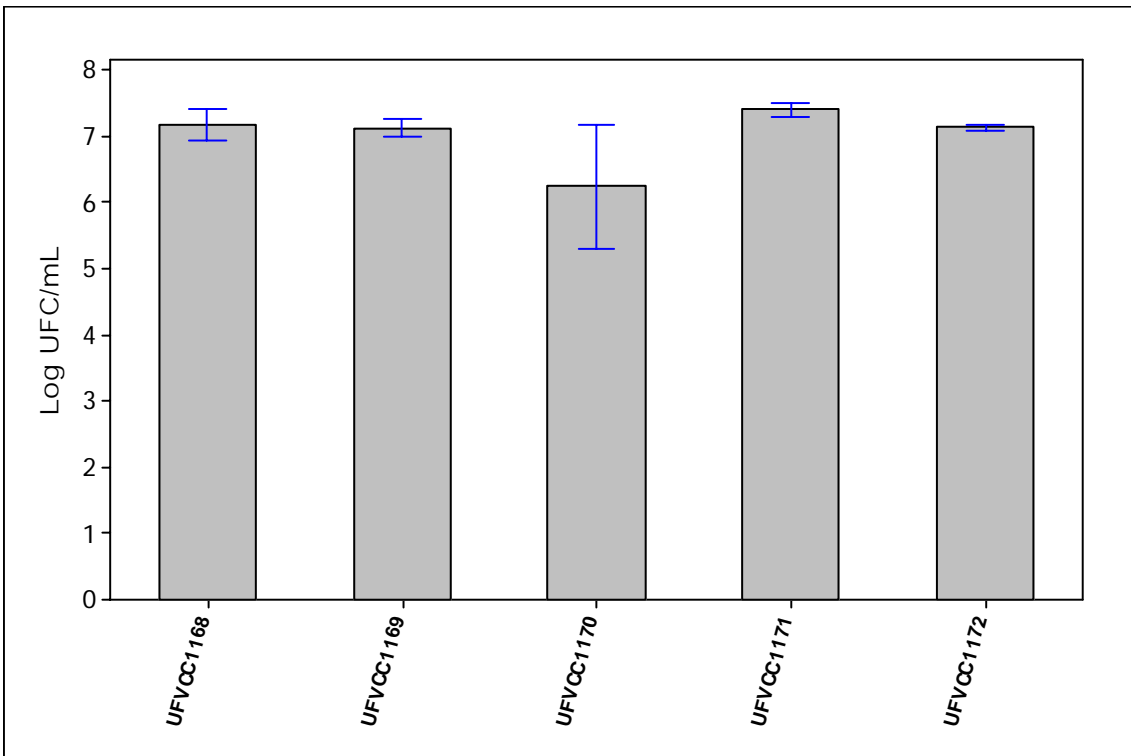


Figura 8- Sobrevivência dos isolados da amostra C ao suco gástrico artificial (pH 2), após 90 minutos.

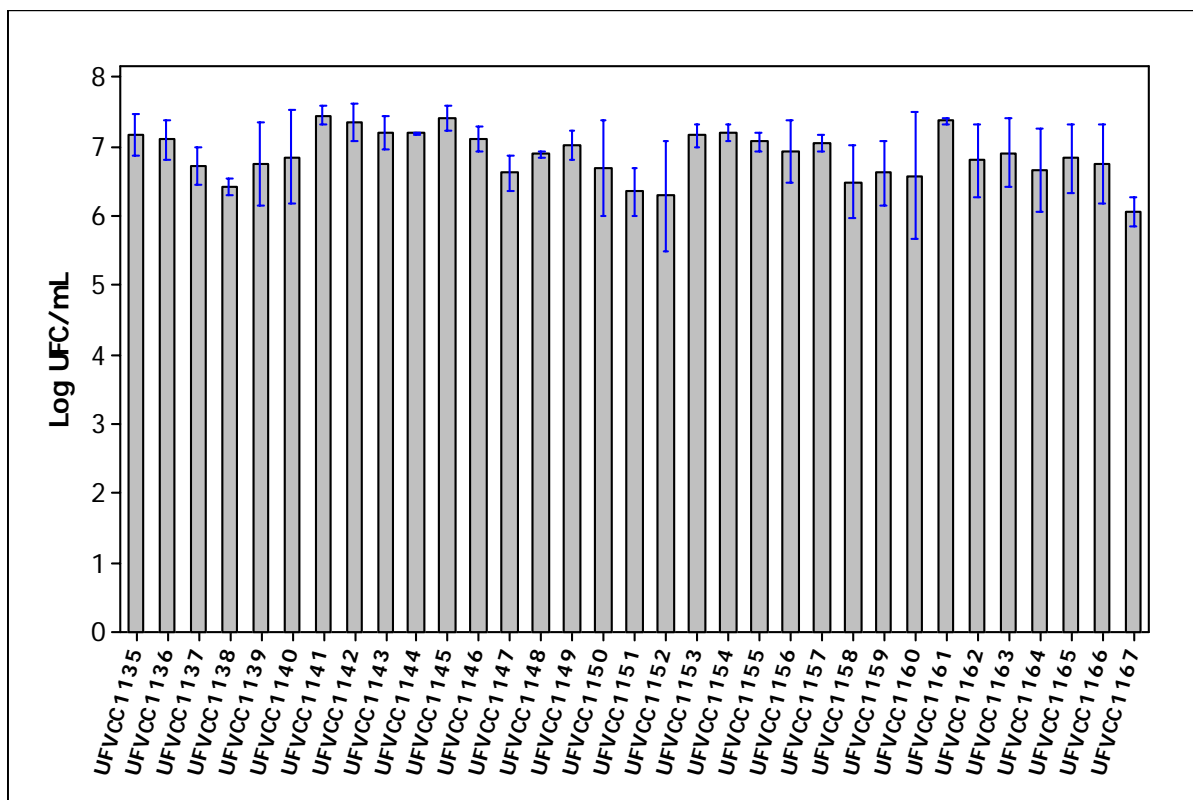


Figura 9- Sobrevivência dos isolados da amostra D ao suco gástrico artificial (pH 2), após 90 minutos.

A resistência à barreira gástrica tem sido descrita como variável, podendo ser estirpe dependente para os microrganismos probióticos (CHARTERIS et al., 1998; CHUNG et al., 1999). Vinderola e Reinheimer (2003) observaram que as bactérias do ácido láctico apresentaram variação na resistência em pH 2 e 3, após 3 horas de incubação, tendo *L. acidophilus* apresentado maior resistência que as demais bactérias lácticas, nos dois valores de pH testados. Em estudo similar, Neumann e Ferreria (1995) avaliaram a resistência de três estirpes de *L. acidophilus* em pH 2, em diferentes intervalos de tempo. Após 3 horas de incubação os autores observaram redução no número de células viáveis de 4, 3 e 2 ciclos log para as estirpes de *L. acidophilus* NCFM-R1, *L. acidophilus* NCFM-R2 e *L. acidophilus* NCFM-S, respectivamente. Charteris et al. (1998), ao simularem a barreira gástrica para bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isoladas do trato gastrointestinal de humanos, também observaram variação na resistência entre as estirpes após 3 horas de incubação.

Considerando as barreiras fisiológicas do trato gastrointestinal, verificou-se que 29 isolados da amostra D, o isolado da amostra B e os quatro isolados da

amostra C apresentaram resistência ao suco gástrico e a sais biliares indicando seu potencial probiótico.

4.4 Suscetibilidade a antibióticos

As estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de fezes de recém-nascidos, apresentaram um perfil de suscetibilidade variado entre os antimicrobianos testados. As Tabelas de 6 a 9, mostra que os isolados obtidos das quatro crianças apresentaram variação em relação aos agentes antimicrobianos, sendo que, dentro de um mesmo grupo a suscetibilidade entre os isolados variou pouco. A susceptibilidade (porcentagem) das estirpes a cada agente antimicrobiano avaliado está indicada na Tabela 10.

Tabela 6- Avaliação da suscetibilidade das 22 estirpes de *Lactobacillus* spp. da amostra A, isoladas de recém-nascidos, aos principais agentes antimicrobianos utilizados na UTI- neonatal de Viçosa-MG

Isolados	Antibióticos																											
	AMP		AMI		CIP		SUL		OXA		GEN		CFE		VAN		AMO		CFL		ERI		MER		PEN		CRO	
UFVCC1179	3,4 ¹	S ²	0,0	R	1,5	I	0,0	R	0,3	R	1,4	I	2,2	S	2,2	S	3,0	S	2,5	S	2,0	I	2,6	S	2,7	R	2,9	S
UFVCC1180	3,6	S	0,9	R	1,3	R	0,0	R	0,8	R	0,9	R	2,4	S	2,0	S	3,2	S	2,5	S	1,9	I	2,6	S	2,8	I	2,8	S
UFVCC1181	3,0	S	0,5	R	1,5	I	0,0	R	0,7	R	0,6	R	2,4	S	1,9	S	3,3	S	2,5	S	1,7	I	2,6	S	2,7	R	2,6	S
UFVCC1182	3,2	S	0,7	R	1,8	I	0,0	R	0,3	R	0,7	R	2,6	S	2,0	S	3,3	S	2,0	S	1,9	I	2,4	S	3,1	S	2,9	S
UFVCC1183	3,1	S	1,2	R	1,7	I	0,7	R	1,0	I	0,0	R	2,3	S	2,1	S	3,1	S	2,6	S	2,2	I	2,6	S	3,1	S	3,0	S
UFVCC1184	3,5	S	0,4	R	1,9	I	0,5	R	0,4	R	0,7	R	2,5	S	2,2	S	3,0	S	2,3	S	1,9	I	2,5	S	3,0	S	2,8	S
UFVCC1185	3,2	S	0,8	R	1,4	R	0,8	R	1,3	S	1,0	R	2,2	S	2,0	S	2,2	S	2,5	S	1,9	I	2,5	S	2,8	R	3,3	S
UFVCC1186	2,9	S	0,0	R	1,8	I	0,6	R	0,8	R	0,5	R	2,2	S	2,1	S	3,1	S	2,2	S	2,0	I	2,3	S	3,1	S	3,0	S
UFVCC1187	3,4	S	0,3	R	1,7	I	0,7	R	1,5	S	0,3	R	2,5	S	2,1	S	3,1	S	2,3	S	1,8	I	2,6	S	2,7	R	3,0	S
UFVCC1188	3,4	S	0,0	R	1,7	I	0,3	R	1,3	S	0,4	R	2,5	S	2,2	S	3,2	S	2,2	S	2,2	I	2,8	S	2,9	S	2,8	S
UFVCC1189	3,0	S	0,5	R	1,8	I	0,8	R	0,8	R	0,3	R	2,3	S	2,2	S	3,2	S	2,5	S	1,6	I	2,4	S	2,7	R	2,7	S
UFVCC1190	3,4	S	0,5	R	1,4	R	0,4	R	1,1	I	0,0	R	2,2	S	1,7	S	3,2	S	2,3	S	1,5	I	2,1	S	2,4	R	3,0	S
UFVCC1191	2,9	R	0,9	R	1,4	R	0,0	R	1,3	I	0,6	R	1,9	S	1,9	S	3,4	S	2,3	S	1,6	I	2,4	S	2,3	R	2,8	S
UFVCC1192	3,5	S	0,0	R	1,3	R	0,6	R	0,8	R	0,4	R	2,2	S	1,9	S	3,1	S	2,2	S	2,1	I	2,2	S	2,6	R	2,7	S
UFVCC1193	3,4	S	0,0	R	1,5	I	0,0	R	0,7	R	0,4	R	2,1	S	1,9	S	2,9	S	1,9	S	1,8	I	2,2	S	2,5	R	2,9	S
UFVCC1194	3,0	S	0,3	R	1,5	R	0,0	R	0,7	R	0,4	R	2,3	S	2,0	S	3,1	S	2,6	S	1,8	I	2,2	S	2,6	R	2,7	S
UFVCC1195	3,1	S	1,0	R	1,5	R	1,3	I	0,9	R	0,6	R	2,4	S	2,1	S	3,0	S	2,3	S	2,0	I	2,4	S	2,8	I	2,8	S
UFVCC1196	2,9	S	0,0	R	1,2	R	0,0	R	0,4	R	0,9	R	2,2	S	1,9	S	3,4	S	2,2	S	1,9	I	2,4	S	2,8	I	2,8	S
UFVCC1197	3,2	S	0,0	R	1,6	I	0,0	R	0,4	R	0,0	R	2,3	S	2,0	S	3,0	S	2,1	S	1,6	I	2,3	S	2,5	R	3,0	S
UFVCC1198	3,0	S	0,5	R	1,5	I	1,0	R	0,5	R	0,3	R	2,3	S	1,8	S	3,6	S	2,2	S	1,7	I	2,3	S	2,7	R	2,9	S
UFVCC1199	3,2	S	0,3	R	1,2	R	0,4	R	1,4	S	0,0	R	2,3	S	2,0	S	2,9	S	2,3	S	2,2	I	2,5	S	2,6	R	3,1	S
UFVCC1200	3,0	S	0,0	R	1,5	I	0,9	R	0,4	R	0,0	R	2,3	S	2,0	S	3,1	S	2,3	S	2,0	I	2,6	S	3,0	S	2,9	S

¹ Diâmetro do halo, em centímetros.

² Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

AMI (amicacina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), OXA (oxacilina), PEN (penicilina), AMO (amoxicilina), VAN (vancomicina), ERI (eritromicina), MER (meropenema), CIP (ciprofloxacina), CFE (cefalexina), CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), SUL (sulfonamida).

Tabela 7- Avaliação da suscetibilidade da estirpe de *Lactobacillus* spp. amostra B, isoladas de recém-nascidos, aos principais agentes antimicrobianos utilizados na UTI- neonatal de Viçosa-MG.

Isolados	Antibióticos																											
	AMP		AMI		CIP		SUL		OXA		GEN		CFE		VAN		AMO		CFL		ERI		MER		PEN		CRO	
UFVCC1178	1,8 ¹	R ²	0,6	R	0,0	R	0,0	R	1,0	I	0,0	I	1,8	S	2,2	S	3,0	S	2,5	S	2,0	I	2,6	S	2,7	R	1,6	I

¹ Diâmetro do halo, em centímetros.

² Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

AMI (amicacina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), OXA (oxacilina), PEN (penicilina), AMO (amoxicilina), VAN (vancomicina), ERI (eritromicina), MER (meropenema), CIP (ciprofloxacina), CFE (cefalexina), CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), SUL (sulfonamida)

Tabela 8- Avaliação da suscetibilidade das nove estirpes de *Lactobacillus* spp. da amostra C, isoladas de recém-nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados na UTI- neonatal de Viçosa-MG

Isolado	Antibióticos																											
	AMP		AMI		CIP		SUL		OXA		GEN		CFE		VAN		AMO		CFL		ERI		MER		PEN		CRO	
UFVCC1168	3,2 ¹	S ²	0,3	R	1,5	R	0,4	R	1,3	I	1,1	R	2,4	S	2,1	S	3,1	S	2,6	S	1,9	I	2,8	S	3,0	S	2,5	S
UFVCC1169	3,2	S	1,8	S	1,1	R	0,0	R	0,0	R	1,4	I	2,5	S	0,5	R	3,1	S	2,6	S	2,1	I	3,3	S	3,2	S	2,0	I
UFVCC1170	3,1	S	1,1	R	0,7	R	0,5	R	0,9	R	1,1	R	2,6	S	1,2	R	3,3	S	2,4	S	1,9	I	3,1	S	2,8	R	2,3	S
UFVCC1171	3,1	S	1,1	R	0,5	R	0,4	R	1,0	I	0,9	R	2,6	S	1,1	R	3,2	S	2,5	S	1,9	I	2,9	S	3,0	S	2,3	S
UFVCC1172	3,1	S	0,3	R	0,6	R	0,0	R	1,1	I	1,0	R	2,3	S	1,2	R	2,9	S	2,4	S	1,8	I	2,9	S	2,8	R	2,0	I

¹ Diâmetro do halo em centímetros

² Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

AMI (amicacina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), OXA (oxacilina), PEN (penicilina), AMO (amoxicilina), VAN (vancomicina), ERI (eritromicina), MER (meropenema), CIP (ciprofloxacina), CFE (cefalexina), CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), SUL (sulfonamida).

Tabela 9- Avaliação da suscetibilidade das 33 estirpes de *Lactobacillus* spp. da amostra D, isoladas de recém –nascidos, aos principais agentes antimicrobianos utilizados na UTI- neo natal de Viçosa- MG.

Isolado	Antibióticos																											
	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO														
UFVCC1135	3,7 ¹	S ²	0,6	R	0,8	R	0,6	R	1,5	S	1,7	S	3,0	S	0,9	R	3,7	S	3,1	S	2,3	S	3,8	S	3,6	S	2,1	S
UFVCC1136	3,7	S	1,4	R	0,4	R	0,8	R	1,4	S	1,7	S	3,0	S	1,8	S	3,7	S	3,0	S	2,6	S	3,4	S	3,6	S	2,2	S
UFVCC1137	3,4	S	1,4	I	0,8	R	1,4	I	1,0	I	1,9	S	2,9	S	0,8	R	3,5	S	2,9	S	2,2	I	3,6	S	3,6	S	2,6	S
UFVCC1138	3,5	S	1,6	I	0,5	R	1,5	I	1,1	I	1,0	R	2,7	S	1,2	R	3,4	S	2,9	S	2,3	S	3,3	S	3,0	S	2,3	S
UFVCC1139	3,5	S	0,6	R	0,8	R	1,1	R	1,8	S	2,2	S	2,7	S	1,3	R	3,3	S	2,3	S	2,0	I	3,7	S	3,4	S	2,4	S
UFVCC1140	3,4	S	1,2	R	0,9	R	0,8	R	1,8	S	1,7	S	2,9	S	0,8	R	3,2	S	3,0	S	2,1	I	3,5	S	3,5	S	2,2	S
UFVCC1141	3,7	S	2,0	S	1,4	R	2,0	S	1,4	S	1,4	I	2,4	S	1,4	R	3,5	S	3,0	S	2,8	S	3,6	S	3,8	S	2,4	S
UFVCC1142	3,6	S	0,9	R	0,4	R	1,0	R	1,7	S	2,2	S	3,2	S	1,3	R	3,7	S	3,2	S	3,0	S	3,7	S	3,5	S	2,4	S
UFVCC1143	3,4	S	1,3	R	0,3	R	0,0	R	1,3	S	1,6	S	2,7	S	1,0	R	3,6	S	3,1	S	2,5	S	3,6	S	3,7	S	2,2	S
UFVCC1144	3,3	S	1,4	R	0,3	R	0,9	R	1,8	S	1,6	S	2,6	S	2,1	S	3,2	S	2,8	S	2,2	I	3,5	S	3,3	S	2,5	S
UFVCC1145	3,6	S	0,4	R	0,0	R	0,0	R	1,9	S	1,7	S	2,9	S	1,4	R	3,5	S	3,0	S	2,4	S	3,5	S	3,5	S	2,1	S
UFVCC1146	3,7	S	1,3	R	0,5	R	0,7	R	2,3	S	1,5	I	2,9	S	1,2	R	3,6	S	2,3	S	2,7	S	3,6	S	3,7	S	2,5	S
UFVCC1147	3,4	S	1,4	R	0,0	R	1,7	S	1,4	S	1,6	S	2,6	S	0,0	R	3,2	S	2,7	S	2,6	S	3,2	S	3,5	S	2,5	S
UFVCC1148	3,6	S	0,4	R	0,0	R	1,9	S	0,9	R	1,4	I	1,9	S	1,1	R	3,4	S	2,4	S	2,6	S	3,3	S	2,9	I	2,0	I
UFVCC1149	3,9	S	1,5	I	1,3	R	0,0	R	1,4	S	1,6	S	3,2	S	1,3	R	3,6	S	2,9	S	2,1	I	3,4	S	3,7	S	2,0	I
UFVCC1150	3,5	S	1,4	I	1,4	R	1,7	I	1,6	S	1,5	I	3,0	S	0,7	R	3,5	S	2,8	S	2,5	S	3,4	S	2,8	I	2,4	S
UFVCC1151	3,3	S	0,7	R	0,0	R	1,6	I	1,2	I	1,4	I	2,3	S	1,3	R	3,3	S	2,8	S	2,3	I	3,3	S	3,4	S	2,1	S
UFVCC1152	3,5	S	1,6	I	0,5	R	1,5	I	1,5	S	1,4	I	2,6	S	1,4	R	3,4	S	2,9	S	1,8	I	3,5	S	3,3	S	2,3	S
UFVCC1153	3,4	S	1,4	I	0,0	R	1,7	S	1,4	S	1,8	S	2,0	S	1,0	R	3,5	S	2,5	S	1,9	I	3,5	S	3,4	S	2,4	S
UFVCC1154	3,1	S	2,0	S	0,3	R	0,7	R	0,4	R	0,5	R	2,2	S	0,5	R	2,8	S	2,7	S	2,1	I	2,6	S	3,2	S	2,0	I
UFVCC1155	3,0	S	1,1	R	0,7	R	1,3	I	0,4	R	1,2	R	2,5	S	0,5	R	3,4	S	2,8	S	2,2	I	3,2	S	3,2	S	2,3	S
UFVCC1156	2,7	R	1,1	R	0,8	R	1,4	I	1,6	S	1,4	I	2,6	S	1,2	R	3,1	S	1,9	S	2,4	S	3,3	S	3,3	S	2,2	S
UFVCC1157	2,9	S	0,9	R	0,4	R	1,9	S	1,2	I	1,4	I	2,7	S	1,1	R	3,2	S	2,3	S	2,1	I	3,2	S	2,8	I	2,2	S

(Continua ...)

Tabela 9 (Continuação)- Avaliação da suscetibilidade das 33 estirpes de *Lactobacillus* spp. da amostra D, isoladas de recém-nascidos, aos principais agentes antimicrobianos utilizados na UTI- neo natal de Viçosa- MG.

Isolados	Antibióticos																											
	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO														
UFVCC1158	3,4 ¹	S ²	0,3	R	0,0	R	0,7	R	0,7	R	1,6	S	2,5	S	0,7	R	3,2	S	2,5	S	2,3	S	3,1	S	3,2	S	2,1	I
UFVCC1159	3,2	S	1,2	R	0,8	R	1,4	I	1,2	I	1,3	I	2,7	S	0,9	R	2,9	S	2,4	S	2,1	I	3,3	S	3,2	S	2,2	S
UFVCC1160	3,2	S	0,7	R	0,3	R	0,0	R	1,4	S	1,1	R	2,5	S	1,1	R	2,9	S	2,6	S	2,2	I	3,0	S	2,9	S	1,8	I
UFVCC1161	3,2	S	1,3	R	1,2	R	0,3	R	1,7	S	1,4	I	2,5	S	1,0	R	3,1	S	2,2	S	2,2	I	3,1	S	2,6	R	2,1	I
UFVCC1162	3,4	S	1,5	I	0,4	R	0,8	R	2,0	S	1,4	I	2,4	S	1,3	R	3,0	S	2,4	S	2,4	S	3,3	S	3,3	S	2,3	S
UFVCC1163	3,4	S	1,0	R	2,2	S	0,0	R	0,9	R	1,0	R	2,6	S	0,4	R	3,2	S	2,2	S	2,4	S	3,2	S	3,2	S	2,3	S
UFVCC1164	3,2	S	1,2	R	0,7	R	1,3	I	1,1	I	1,4	I	2,4	S	0,4	R	3,2	S	2,2	S	2,3	S	3,1	S	3,3	S	2,1	S
UFVCC1165	3,2	S	1,0	R	0,0	R	2,3	S	1,8	S	1,7	S	2,7	S	0,8	R	2,6	S	2,6	S	1,8	I	3,1	S	3,5	S	2,4	S
UFVCC1166	3,1	S	1,7	S	1,3	R	0,4	R	1,6	S	1,3	I	2,3	S	1,4	R	3,3	S	2,4	S	2,4	S	3,1	S	3,0	S	1,4	I
UFVCC1167	3,1	S	0,4	R	0,0	R	0,7	R	0,8	R	1,7	S	2,7	S	0,5	R	3,0	S	2,5	S	1,9	I	3,0	S	3,2	S	1,9	I

¹ Diâmetro do halo, em centímetros.

² Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

AMI (amicacina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), OXA (oxacilina), PEN (penicilina), AMO (amoxicilina), VAN (vancomicina), ERI (eritromicina), MER (meropenema), CIP (ciprofloxacina), CFE (cefalexina), CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), SUL (sulfonamida).

Tabela 10- Suscetibilidade antimicrobiana dos 61 isolados de fezes de recém nascidos

Grupo antimicrobiano	Agente antimicrobiano (concentração)	Classificação		
		Resistente	Intermediário	Sensível
β-lactâmicos- penicilinas	Penicilina (10 UI)	17	6	38
	Oxacilina (1μg)	23	13	25
	Ampicilina (10μg)	3	0	58
β-lactâmicos- inibidores de lactamase	Amoxicilina (20 μg)	1	0	60
β-lactâmicos- cefalosporina	Cefalexina (30μg)	0	0	61
	Ceftriaxona (30μg)	0	11	50
	Cefalotina (30μg)	0	1	60
β-lactâmicos Carbapenêmicos	Meropenem (10μg)	0	0	61
Quinolonas	Ciprofloxacina (5μg)	47	13	1
Aminoglicosídeos	Amicacina (30 μg)	50	7	4
	Gentamicina (10μg)	31	15	15
Macrolídeos	Eritromicina (15μg)	0	44	17
Glicopeptídeos	Vancomicina (30μg)	36	0	25
Sulfas	Sulfonamida (300μg)	45	10	6

A classe de antibióticos β-lactâmicos apresenta quatro grupos, β-lactâmicos-penicilina, β-lactâmicos-inibidores de lactamase, β-lactâmicos-cefalosporina e β-lactâmicos-carbapenêmicos, classe em que os isolados apresentaram variação no perfil de suscetibilidade em relação aos antibióticos desta classe.

Para os antibióticos do grupo β-lactâmicos-penicilina, os isolados das amostras C e D foram sensíveis à ampicilina e apenas o isolado UFVCC1178 da amostra B e o isolado UFVCC1191 da amostra A foram resistentes a esse antibiótico.

O isolado da amostra B, 59,1 % dos isolados da amostra A, 40 % da amostra C e o isolado UFVCC1161 da amostra D foram resistentes à penicilina. A oxacilina apresentou efeito inibitório sobre o isolado da amostra B, os isolados das amostras A, C e D foram resistentes em 68,2, 40 e 18,2%, respectivamente, a esse antibiótico.

Apenas o isolado UFVCC1178 da amostra B foi resistente à amoxicilina, pertencente à classe dos β-lactâmicos- inibidores de lactamases.

Na classe dos β -lactâmicos-cefalosporina, todos os isolados das amostras foram sensíveis à cefalexina. Apenas o isolado UFVCC1178 da amostra B apresentou resistência intermediária à cefalotina; os demais isolados foram sensíveis a esse antibiótico. A ceftriaxona apresentou efeito inibitório sobre todos os isolados da amostra A, tendo o isolado UFVCC1178 da amostra B, os isolados UFVCC1169 e UFVCC1172 da amostra C e UFVCC1148, UFVCC1149, UFVCC1154, UFVCC1158, UFVCC1158, UFVCC1160, UFVCC1161, UFVCC1166 e UFVCC1167 da amostra D apresentado resistência intermediária.

A sensibilidade de todos os isolados das amostras ao meropenem, pertencente à classe dos β -lactâmicos carbapenêmicos, se deve ao seu amplo espectro de ação sobre a maioria dos grupos bacterianos. Este resultado corrobora com o encontrado por Murray e Niles (1990), que observaram suscetibilidade ao antibiótico meropenem nas quatro estirpes de *Lactobacillus* spp..

O gênero *Lactobacillus* não apresentou um padrão característico no perfil de suscetibilidade aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos; essa variação também foi observada em outros estudos. Bactérias do gênero *Lactobacillus* foram suscetíveis à penicilina, ampicilina (KATLA et al., 2001; COEURET et al., 2003; ZHOU et al., 2005; HERREROS et al., 2005; KHEARDR, 2006), oxacilina (HENGYIXU et al., 2008), cefalotina (KATLA et al., 2001; COEURET et al., 2003; ZHOU et al., 2005) e à amoxicilina (VERDENELLI et al., 2009). No entanto, várias estirpes de *Lactobacillus* foram resistentes à oxacilina, cefalotina (DANIELSEN; WIND, 2003), penicilina (ZARAZAGA et al., 1999), cefalexina (COPPOLA et al., 2005) e à ceftriaxona (GOLDSTEIN et al., 2000; CROCO et al., 1994).

Dentre os 61 isolados, 40,9% da amostra A, 50% amostra B, 66,7% amostra C e 96,9% amostra D foram resistentes ao antibiótico ciprofloxacina. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Elkins e Mullis (2004) que verificaram que 77,8% dos isolados de *Lactobacillus* testados apresentaram-se resistentes à ciprofloxacina. A resistência se deve principalmente a mutações no DNA girase e topoisomerase IV, alvo deste antibiótico (BERGER-BÄCHI, 2002).

Constatou-se para os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina, que os isolados da amostra A tiveram alta resistência a ambos os antibióticos, 100% à amicacina e 95,5% à gentamicina. O isolado da amostra B apresentou resistência aos dois antibióticos desta classe. Os isolados da amostra C apresentaram 80 % de resistência aos antibióticos amicacina e gentamicina. Os

isolados da amostra D apresentaram 69,7% de resistência à amicacina e 15,2% à gentamicina. A resistência aos antibióticos amicacina e gentamicina observada para a maioria dos isolados também foi relatada em outros estudos, para bactérias do gênero *Lactobacillus*, pelo método de difusão em placas (DANIELSEN; WIND, 2003; ELKINS; MULLIS, 2004; HERREROS, et al., 2005). Esses antibióticos não são efetivos contra bactérias Gram positivas anaeróbias, em razão da impermeabilidade da membrana, em função da redução do potencial de membrana em condições de anaerobiose, o que pode explicar a resistência observada para a maioria dos isolados (DAVIS, 1987, citado por ELKINS; MULLIS, 2004).

Observou-se que todos os isolados da amostra A, 50% da amostra B e 44,4% da amostra C foram resistentes e 90,9% dos isolados da amostra D apresentaram-se sensíveis à vancomicina. Katla et al. (2001) e Herreros et al. (2005) avaliaram a resistência de lactobacilos à vancomicina, e constataram que todos os isolados foram resistentes. A vancomicina é um antibiótico de amplo espectro; usado para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas; esse antibiótico inibe o último estágio de formação da parede celular (BERGER-BÄCHI, 2002). A resistência observada para alguns dos isolados pode ser explicada pelo fato de algumas espécies de *Lactobacillus* apresentarem uma parede de peptidoglicano insensível à ação de vancomicina (WRIGHT, 2005).

O isolado da amostra B, todos os isolados da C, 95 % dos isolados A e 55% D apresentaram-se resistentes à sulfonamida. Essa resistência é um fato comum na natureza e é geralmente mediada por plasmídeos (TORTORA et al., 2000). Portanto, pode-se sugerir a possibilidade das estirpes sensíveis terem perdido o plasmídeo responsável por esta resistência.

O perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos é um importante parâmetro a ser avaliado em novos isolados, sendo este um pré-requisito no processo de seleção de probióticos.

Em função da variação no perfil de suscetibilidade das bactérias do gênero *Lactobacillus*, esta característica deve ser avaliada com critério, visto que a resistência a alguns desses antimicrobianos encontra-se associada a características intrínsecas do microrganismo, não representando riscos de transferência de genes de resistência a microrganismos sensíveis. O perfil de suscetibilidade aos 14 antibióticos foi similar entre as amostras, em que todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cefalexina e meropenem, 98,5% dos isolados foram sensíveis à

amoxicilina e 95,5% à ampicilina. No entanto, os isolados UFVCC1170 e UFVCC1178 apresentaram resistência a 50% dos antibióticos, devendo sua utilização ser evitada, considerando que a origem dessa resistência não é conhecida. Da mesma forma, a baixa resistência observada para os demais isolados pode ser extra-cromossomal, o que exige uma análise mais detalhada.

4.5 Atividade antagonista dos isolados de *Lactobacillus* spp. a patógenos

A atividade antagonista é uma característica de funcionalidade a ser avaliada para novos isolados com características probióticas. O efeito antimicrobiano dos 61 isolados de *Lactobacillus* spp. das amostras A, B, C e D foi avaliado a partir de duas técnicas: *spot* e difusão em placas.

Na técnica de *spot* os isolados da amostra A, C e D apresentaram efeito inibitório variável aos microrganismos patogênicos testados em meio tamponado e não tamponado, tendo o isolado da amostra B apresentado efeito inibitório em ambos os meios (Tabela 11).

Tabela 11- Número de estirpes de *Lactobacillus* spp. que apresentaram antagonismo aos patógenos avaliados pelo teste de *spot* em meio tamponado e não tamponado

Amostra	Meio de cultura	Bactérias indicadoras			
		<i>Salmonella</i> sp. (ATCC 6539)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)
A	Não tamponado	17 ¹ /22 ²	18 ¹ /22 ²	21 ¹ /22 ²	21 ¹ /22 ²
	Tamponado	16/22	18/22	21/22	19/22
B	Não tamponado	1/1	1/1	1/1	1/1
	Tamponado	1/1	1/1	1/1	1/1
C	Não tamponado	5/5	5/5	5/5	5/5
	Tamponado	4/5	5/5	5/5	5/5
D	Não tamponado	33/33	22/33	28/33	33/33
	Tamponado	30/33	7/33	14/33	28/33

1- Número de estirpes de *Lactobacillus* spp. que apresentaram atividade antagonística ao crescimento dos patógenos avaliados.

2- Número de estirpes de *Lactobacillus* spp. avaliadas.

As bactérias do gênero *Lactobacillus*, geralmente, são capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, em função da produção de compostos inibitórios, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (JACOBSEN et al., 1999; LOESSNER et al., 2003). O efeito antagônico observado nesta experimentação parece ser pH independente, uma vez que em meio

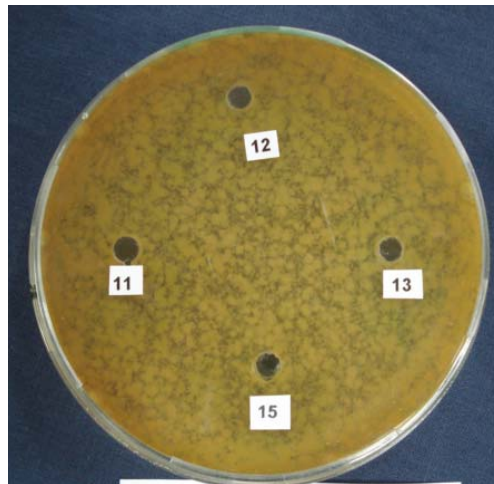
tamponado a atividade inibitória não foi reduzida para a maioria das estirpes, o que sugere a existência de outros compostos inibitórios, além dos ácidos orgânicos. A hipótese de inibição por peróxido de hidrogênio foi rejeitada, uma vez que o teste foi realizada em condições de anaerobiose.

Esses resultados estão em conformidade com os encontrados por Bernet-Camard et al. (1997), que constataram a presença de outras substâncias antimicrobianas, além do ácido láctico, produzidas por *L. acidophilus* com atividade inibitória sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*.

Poppi et al. (2008) verificaram o efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*, pelo método *spot*, de *L. delbrueckii delbrueckii* (17fb) e *L. reuteri* (18fa) em meio não tamponado, não tendo sido observado em meio tamponado. Os autores sugeriram que a inibição foi devido aos ácidos orgânicos. Em estudo semelhante, Fernández et al. (2003), ao avaliarem o espectro de inibição das estirpes de *L. acidophilus* UO 001 e *L. gasseri* UO 002 isolados de humanos, verificaram efeito inibitório em relação *Clostridium* sp., *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*. Os autores associaram a inibição à produção de ácidos orgânicos.

No método de difusão em placas, *Well diffusion assay*, o sobrenadante livre de células dos isolados das diferentes amostras não promoveram atividade inibitória sobre o crescimento dos microrganismos patogênicos *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) e *L. monocytogenes* (ATCC 15313) (Figura 1).

Esses resultados corroboram com os encontrados por Drago et al.(1997), que não observaram atividade inibitória de três estirpes de *Lactobacillus*, isoladas de humanos, em relação às enterobactérias *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Vibrio cholera*. Similarmente, Maragkoudakis et al. (2006) não verificaram inibição das bactérias indicadoras testadas por *Lactobacillus* isolados de produtos fermentados por este método.



Legenda: 11 (UFVCC1188); 12 (UFVCC1189); 13 (UFVCC1190); 15 (UFVCC1191).

Figura 10- Atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de recém-nascidos a *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), pela técnica de difusão em placas.

No presente estudo, verificou-se que os 61 isolados apresentaram atividade inibitória variável sobre o crescimento de *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) e *L. monocytogenes* (ATCC 15313), mesmo em meio tamponado, o que sugeriu a existência de outros compostos inibitórios, além dos ácidos orgânicos.

A diferença observada entre as duas técnicas pode ter ocorrido devido à concentração da substância inibitória presente no sobrenadante no método de difusão em placas, uma vez que a concentração desta no filtrado não foi suficiente para induzir a inibição, como a detectada pelo teste de *spot*. Olivares et al. (2005) constataram inibição das bactérias indicadoras após a concentração do sobrenadante.

Outra hipótese seria a necessidade da presença de um fator de indução para que a substância inibitória seja produzida. Segundo Touré et al. (2003), a incapacidade de detectar atividade inibitória pelo método de difusão do sobrenadante em ágar não necessariamente implicou a ausência da atividade antibacteriana, mas sim a perda do contato célula-célula entre o indicador (patógeno) e a bactéria produtora.

Portanto, a atividade antagônica observada nesta experimentação sugere a necessidade de avaliar o efeito inibitório de bactérias probióticas por mais de uma técnica, uma vez que os mecanismos são diferentes.

4.6 Atividade hemolítica e gelatinase

Dentre os 61 isolados de *Lactobacillus* spp., constatou-se atividade β – hemólise no isolado da amostra B, em 40 % os isolados da amostra C, em 90,9 % dos isolados da amostra A e em 33,3 % da amostra D. A atividade α –hemolítica foi observada em 9,1 % dos isolados da amostra A, em 60 % dos isolados da amostra C e em 57,6 % dos isolados da amostra D. Apenas três isolados da amostra D não apresentaram atividade hemolítica (γ – hemólise) (Tabela 12).

Tabela 12- Atividade hemolítica de isolados das diferentes amostras de *Lactobacillus* spp. de recém-nascidos

Amostra	Atividade hemolítica		
	α – hemólise	β – hemólise	γ – hemólise
A	2/22	20/22	0/22
B	0/1	1/1	0/1
C	3/5	2/5	0/5
D	19/33	11/33	3/33

A produção de hemolisina é um fator de virulência comum entre vários microrganismos patogênicos, que facilita a disponibilidade de ferro utilizado durante seu metabolismo e causa anemia e edema no hospedeiro (VERTERLUND et al., 2007).

Bactérias do ácido láctico, por serem microrganismos fastidiosos, apresentam um grande requerimento nutricional, e normalmente os meios de crescimento incluem ferro e/ou manganês. Espécies de lactobacilos são capazes de crescer em meios com ausência de ferro, apresentando uma exigência absoluta de manganês para o seu crescimento ótimo (IMBERT; BLONDEU, 1998). No entanto, na literatura têm sido relatados casos de estirpes de *Lactobacillus* produtores de hemolisina, como observado neste estudo (Tabela 12). Baumgartner et al. (1998) constataram atividade α -hemolítica em sangue de carneiro para as 53 estirpes de *L. rhamnosus*. Similarmente, Maragkoudakis (2006) verificou que das 29 estirpes de lactobacilos de origem láctea quatro apresentaram atividade α -hemolítica em sangue humano.

Nenhum dos isolados apresentaram atividade de gelatinase, que é uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar a gelatina, o colágeno, a caseína, a

hemoglobina e outros peptídeos bioativos. Essas proteinases são associadas a processos inflamatórios e são associadas com virulências em seres humanos e animais (KANEMITSU et al., 2001). A presença dessa enzima tem sido relacionada às bactérias do gênero *Enterococcus* (KANEMITSU et al., 2001; LOPES et al., 2006). Relatos da presença de sua atividade em bactérias do gênero *Lactobacillus* não foram encontrados.

A atividade hemolítica constatada em algumas das estirpes estudadas evidencia que estudos desta natureza devem ser efetivados para bactérias do gênero *Lactobacillus*, mesmo sabendo que esse mineral não é essencial para o seu crescimento e que tal fator de virulência compromete o seu caráter probiótico, pelos danos que poderiam causar à saúde do hospedeiro

Os isolados UFVCC1152, UFVCC1153 e UFVCC1155 seriam os isolados mais indicados para o prosseguimento do estudo sobre o potencial de seu uso como probiótico, considerando que não expressaram os fatores de virulência avaliados.

5- Conclusões

Os 61 isolados apresentaram variação em relação às características probióticas e de segurança, onde apenas três isolados poderiam ser indicados como potencialmente probióticos neste estudo, considerando que não apresentaram atividade hemolítica e gelatinase, o que indica a importância da avaliação dos aspectos de segurança, pois estes deveriam ser primeiros testes a ser realizados no processo de seleção de novos isolados.

Embora as estirpes UFVCC1152, UFVCC1153 e UFVCC1155 não tenham apresentado atividade α ou β -hemólise e atividade gelatinase, estas não usufruem de todas as características probióticas avaliadas, sendo a utilização como *pool* a melhor estratégia de aplicação, uma vez que os fenótipos estudados se complementam.

Os resultados encontrados não devem ser extrapolados para as bactérias de gênero *Lactobacillus* e nem para espécies identificadas, uma vez que as características de funcionalidade, segurança e tecnológica podem ser estirpe dependente. Portanto, cada novo isolado deve ser avaliado para todos os requisitos definidos no relatório da elaboração de diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos (FAO/WHO, 2002), para que o profissional de saúde tenha à sua disposição estirpes bem caracterizadas e seguras.

6- Referências bibliográficas

- ARVOLA, T., LAIHO, K., TORKKELI S., MYKKÄNEN H., SALMINEN, S., MAUNULA, L. AND ISOLAURI, E. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. **Pediatrics**, 104, 1999.
- AUSTIN, D.J., KRISTINSSON, K.G. AND ANDERSON, R.M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96, 1152–1156, 1999.
- AXELSSON L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1–72, 1998.
- BAYER, A.S., CHOW, A.W., BETTS, D. AND GUZE, L.B. *Lactobacillus* bacteremia report of nine cases, important clinical and therapeutic considerations. **American Journal of Medicine**, 64, 808- 813, 1978
- BAUMGARTNER, A., KUEFFER, M., SIMMEN, A. AND GRAND, M. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 31, 489–494,1998.
- BERADA N., LEMELAND J., LAROCHE G., THOUVENOT P. AND PIAIA M. *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. **Journal of Dairy Science**, 74, 409–13, 1991.
- BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal Medicine Microbiology**, 35, 292, 27, 2002.
- BERNARDEAU M., GUGUEN M. AND VERNOUX J.P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. **FEMS Microbiology Reviews** 30, 487–513, 2006.
- BERNARDEAU M., VERNOUX J.P., HENRI-DUBERNET S. AND GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, 126, 278–285, 2006.

- BERNET-CAMARD, M.F., LIEVIN, V., BRASSART, D., NEESER, J.R., SERVIN, A.L. AND HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 2747–2753, 1997.
- BRUNO M.E.C. AND MONTVILLE T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 3003-3010, 1993.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L., AND COLLINS, J.K. Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, 84, 759–768, 1998.
- CHRISTIAENS, H., LEER, R.J., PAUWELS, P.H. AND VERSTRAETE, W. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. **Applied and Environmental Microbiology**, 58:3792– 3798, 1992.
- CHOMARAT, M. AND ESPINOUSE, D. *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in patients with prolonged aplasia receiving ceftazidime-vancomycin. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, 10:44, 1991.
- CHOU, L. AND WEIMER, B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science** 82, 23– 31, 1999.
- CHUNG, H.S., KIM, Y.B., CHUN, S.L. AND JI, G.E. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology** 47, 25– 32, 1999.
- CLARK, P.A., COTTON, L.N. AND MARTIN, J.H. Selection of *Bifidobacterium* spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs. **Cult. Dairy Prod. J**, 28: 11–14, 1993.
- CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES, I.F. AND CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 71, 1-20, 2001.

- COEURET, V., GUEGUEEN, M. AND VERNOUX, J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, 71, 451-460, 2004.
- COLLINS, M.D., RODRIGUES, U.M., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J.A.E., MARTINEZ- MURCIA, A., PHILLIPS, B.A., WILLIAMS, A.M. AND WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, 77, 5-12, 1991.
- CONWAY, P.L., GORBACH, S.L. AND GOLDIN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science** 70, 1 -12, 1987.
- COPPOLA, R., SUCCI, M., TREMONTE, P., REALE, A., SALZANO, G. AND SORRENTINO, E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait**, 85, 193-204, 2005.
- COURVALIN, P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. **Digestive and Liver Disease**. 38 (Suppl. 2), 261-265, 2006a.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, 42(Suppl 1), 25-34. 2006b.
- CROCO, J.L., ERWIN, M.E., JENNINGS, J.M., PUTNAM, L.R. AND JONES, R.N. Evaluation of the Etest for antimicrobial spectrum and potency determinations of anaerobes associated with bacterial vaginosis and peritonitis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 20, 213- 219, 1994.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 34, 245-253, 2002.
- DANIELSEN, M. AND WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**. 82, 1-11, 2003.
- DE GROOTE, M.A., FRANK, D.N., DOWELL, E., GLODE, M.P. AND PACE, N.R. *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 24, 278-280, 2005.

- DU TOIT, M., FRANZ, C.M.A.P., DICKS, L.M.T., SCHILLINGER, U., HABERER, P., WARLIES, B., AHRENS, F. AND HOLZAPFEL, W.H. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for preliminary minipig feeding trial and their effect on serum levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, 40, 93–104, 1998.
- Elkins C. A. and L. B. Mullis. Bile-mediated sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 7200–7209, 2004.
- ELKINS, C.A., MOSER, S.A. AND SAVAGE, D.C. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. **Microbiology**, 147, 3403–3412, 2001.
- ELLI, M., ZINK, R., RYTZ, A., RENIERO, R. AND MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 695-703, 2000.
- FERNÁNDEZ M.F., BORIS S. AND BARBÉS C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, 94, 449–455, 2003.
- FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias lácticas probióticas. In: Ferreira, CLLF, ed. Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Suprema Gráfica e Editora, Rio Branco, MG. 7-26p, 2003.
- FERREIRA, C.L. AND GILLILAND, S.E. Bacteriocin Involved in Premature Death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM During Growth at pH 6. **J. Dairy Science**, 71, 306-315, 1988.
- FLEMING, H. P., ETCHELLS, J.L. AND COSTILOW, R.N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology** ; 30(6), 1040-2, 1975.
- FLYNN, S., VAN SINDEREN, D., THORNTON, G.M., HOLO, H., NES, I. F. AND COLLINS, J. K. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. **Microbiology**, 148, 973–984, 2002.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso: 29/10/2008. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: R Fuller (Ed) Probiotics. The Science basis. New York. Chapman and hall, 111-144, 1992.
- GASTRIC JUICE. In: United States pharmacopeia. 20. Ed. s. 1, p.1105, 1980.
- GIBSON, G. R. AND FULLER, R. aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **The Journal of Nutrition**, 130, 391S-395S, 2000.
- GILLILAND, S.E., STALEY, T.E. AND BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science** 67, 3045–3051, 1984.
- GOLDSTEIN, E.J.C., CITRON, D.M., MERRIAM, C.V., WARREN, Y. AND TYRRELL, K.L. Comparative in vitro activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. **Antimicrob. Agents Chemother**, 44, 2389– 2394, 2000.
- GRIFFIN I.J., DAVILA, P.M. AND ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes, **British Journal of Nutrition**, 87, 187-191, 2002.
- HALLER, D., COLBUS, H., GÄNZLE, M.G., SCHERENBACHER, P., BODE, C. AND HAMMES, W.P. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. **Systematic and Applied Microbiology**, 24, 218–226, 2001.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T., GIBSON, G.R. AND BRUCK, W. Some insight into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. **British Journal of Nutrition**, 90, 845, 2003.

- HERREROS, M.A., SANDOVAL, H., GONZÁLEZ, L., FRESNO, J.M. AND TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**, 22, 455-459, 2005.
- HOLDEMAN L.V., CATO E.P. AND MOORE W.E.C. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 1987, 167p.
- HOLZAPFEL, W.H., GEISEN, R. AND SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 24, 343-362, 1995.
- HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 41, 85-101, 1998.
- HUIS IN'TVELD, J.H.J. AND SHORTT, C. Selection criteria for probiotic microorganisms. In: Leeds, A.R., Rowland, I.R. Ed . Gut Flora and Healthc – past, present and future. Internaciona Congress and Symposium 219, Royal Society of Medicine Press Limited, 27-36, 1996.
- HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, 57, 331-334, 2008.
- HYUN-SU, J., JEONG-MIN, J. AND JAE-SEONG, S. Lack of correlation between H₂O₂ production and *in vitro* anti-staphylococcal activity of vaginal *Lactobacillus* spp. **African Journal of Biotechnology**, 8, 2271-2278, 2009.
- IBRAHIM S.A. AND BEZKOROVAINY, A. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 62, 351-4, 1993.
- IMBERT, M. AND BLONDEAU, R. On the iron requirement of Lactobacilli grow in chemically defined medium. **Current Microbiology**, 37, 64-66, 1998.
- ISOLAURI, E., ARVOLA, T., SUTAS, Y, MOILANEN, E. AND SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clinical and experimental allergy**, 30, 1604-1610, 2000.
- ISOLAURI, E., SALMINEN, S. AND OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 18, 299-313, 2004.
- JACK, R.W., TAGG, J.R. AND RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, 59, 171-200, 1995.

- KABUKI, T., SAITO, T., KAWAI, Y., UEMURA, J. AND ITOH, T. Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **International Journal of Food Microbiology**, 34, 145–156, 1997.
- KAISER, A.L. AND MONTVILLE, T.J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, 75, 536-540, 1993.
- KAISER A.L. AND MONTVILLE T.J. Purification of the bacteriocin MN and characterization of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipids Vesicles. **Applied and Environmental Microbiology** 62, 4529-4535, 1996.
- KALLIOMAKI, M., SALMINEN, S., ARVILOMMI, H., KERO, P., KOSKINEN, P. AND ISOLAURI, E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, 357. 1076-1079, 2001.
- KALLIOMÄKI, M., SALMINEN, S., POUSSA, T., ARVILOMMI, H. AND ISOLAURI E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, 361, 1869-1871, 2003.
- KANATANI, K., OSHIMURA, M. AND SANO, K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology** 61,1061–1067, 1995.
- KANDLER, O. AND WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore M.D., USA, 1209–1234, 1986.
- KANEMITSU, K., NISHINO, T., KUNISHIMA, H., OKAMURA, N., TAKEMURA, H., YAMAMOTO, H. AND KAKU, M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. **Journal of Microbiological Methods**, 47,11–16,2001.
- KATLA, A.K., KRUSE, H., JOHNSEN, G. AND HERIKSTAD, H., Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, 67,147–152, 2001.
- KHEADR, E.E. Impact of acid and oxgall on susceptibility of probiotic lactobacilli. **African Journal of Agricultural Research**, 1, 172-181, 2006.
- KLAENHAMMER T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**,12, 39-85, 1993.

- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C. AND REUTER, G. Taxonomy and physiology of bacteria lactic acid bacteria. **International Journal Food Microbiology**, 41, 103-125, 1998.
- KLIGLER, B., HANAWAY, P. AND COHRSSSEN, A. Probiotics in Children. **Pediatric Clinics of North America**, 54, 949–967, 2007.
- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. **Journal of American Dietetic Association**, 101, 229-241, 2001.
- KUKKONEN, K., HAAHTELA, T., JUNTUNEN-BACKMAN, K., KORPELA, R., POUSSA, T. AND TUURE, T. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 7, 119-192, 2007.
- LANKAPUTHRA, W.E.V. AND SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal** 30, 2 –7, 1995.
- LEE Y.K. AND SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science Technology**, 6, 241–245, 1995.
- LEER, R.J., VAN DER VOSSEN, J. M. VAN GIEZEN, M. VAN NOORT, J. M. AND POUWELS, P. H. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiology**, 141, 1629–1635, 1995.
- LEHTO, E.M. AND SALMINEN, S.J. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 18, 125–132, 1997.
- LEVRI, K.M., KETVERTIS, K., DERAMO, M., MERENSTEIN, J.H. AND D'AMICO, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. **Journal of Family Practice**, 54, 613–620, 2005.
- LOPES, M.F.S., SIMÕES, A.P., TENREIRO, R., MARQUES, J.J.F., CRESPO, M.T.B. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, 112, 208–214, 2006.
- MACFARLANE, G.T. AND CUMMINGS, J.H. Probiotics, infection and immunity. **Current Opinion in Infectious**, 15, 501–506, 2002.

- MACKAY, A.D., TAYLOR, M.B., KIBBLER, C.C. AND HAMILTON-MILLER, J.M. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. **Clinical Microbiology and Infection**, 5, 290–292, 1999.
- MACKIE, R.I., SGHIR, A. AND GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition** 69, 1035-1045, 1999.
- MAN, J. D., ROGOSA, M. A. AND SHARPE, M.A. Medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology** 23; 130-135, 1960.
- MARAGKOUidakis, P.A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., POT, B., AND TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, 16, 189–199, 2006.
- MATHUR, S. AND SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 105, 281– 295, 2005.
- MIDOLO, P.D., LAMBERT, J.R., HULL, R., LUO, F. AND GRAYSON, M.L. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, 79, 475-479, 1995.
- MITSUOKA, T. Intestinal bacteria and health, Tokyo: Harcourt Brace Jovarnovich Japan, 1978, 208p.
- MITSUOKA, T. Microbes in the intestine- our lifelong partners Yakult Honsha Co., Std Tokyo, 1989, 104 p.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. Asia Pacific. **Journal of Clinical Nutrition**. 1, 2-9, 1996.
- MOSER, S.A. AND SAVAGE, D.C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**. 67, 3476–3480, 2001.
- MROZ, Z. Supplementary organic acids and their interactive effects with microbial phytase in diets for pigs and poultry. **Proc. Annual Conference Phytase in Anim. Nutrition**,1, 2000.
- MURIANA, P.M. AND KLAENHAMMER, T.R. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. **Journal of Bacteriology**, 173, 1779–1788, 1991.
- MURRAY, P.R. AND NILES, A.C. In vitro activity of meropenem (sm-7338), imipenem, and five other antibiotics against anaerobic clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 13, 57-61, 1990.

- NEUMANN, E. AND FERREIRA, C. L. L. F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: “in vitro” susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, 26, 59-65, 1995.
- OLIVARES M., DÍAZ-ROPERO M.P., MARTÍN R., RODRÍGUEZ J.M. AND XAUS J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. **Journal of Applied Microbiology**, 101, 72–79, 2006.
- ORLA-JENSEN, S. In: Orla-Jensen, S. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria*. Høst, Copenhagen, 1–196, 1919.
- PERDIGON, G., FULLER, R. AND RAYA, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, 2, 27-42, 2001.
- PIARD, J.C AND DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. **Lait**, 71, 525-541, 1991.
- POPPI, L.B., MANCILHA, I.M., FERREIRA, A.J.P. AND LEAL, D.D.M. Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* *in vitro*. **Brazilian Journal Food Technology**, 11, 113-119, 2008.
- REID, G. AND BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes Infection**, 4, 319–324, 2002.
- ROBREDO, B., SINGH, K. V., BAQUERO, R., MURRAY, B. E. AND TORRES, C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. **International Journal of Food Microbiology**, 54, 197–204, 2000.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J.A. AND WISEMAN, R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal lactobacilli. **Journal of Bacteriology**, 62, 132–133, 1951.
- ROSENFELDT, V., MICHAELSEN, K.F., JAKOBSEN, M., LARSEN, C.N., MOLLER, P.L., TVEDE, M., WEYREHTER, H., VALERIUS, N.H. AND PARREGAARD, A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 21, 417-419, 2002.
- SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J. AND MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, 84, 197-215, 2000.

- SALMINEN, S., ISOLAURI, E. AND SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 70, 347-358, 1996.
- SALMINEN, M.K., RAUTELIN, H., TYNKKYNNEN, S., POUSSA, T., SAXELIN, M., VALTONEN, V. AND JÄRVINEN, A. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. **Clinical Infectious Diseases**, 38, 62–69, 2004.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, 61, 91-99, 2003.
- SERINO, M., LUCHE, E., CHABO, C., AMAR, J. AND BURCELIN, R. Intestinal microflora and metabolic diseases. **Diabetes & Metabolism**, 1-11, 2009.
- SIMAKACHORN, N., PICHAIPAT, V., RITHIPORNPAISARN, P., KONGKAEW, C., TONGPRADIT, P. AND VARAVITHYA, W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 30, 68-72, 2000.
- STRUS, M., PAKOSZ, K., GOSCINIAK, H., PRZONDO-MORDARSKA, A., ROZYNEK, E., PITUCH, H., MEISEL-MIKOLAJCZYK, F. AND HECZKO, P.B. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). **Med. Dosw. Mikrobiol**, 53, 133–142, 2001.
- SU, Y.A., SULAVIK, M.C., HE, P., MAKINEN, K.K., MAKINEN, P.L., FIEDLER, S. WIRTH, R. AND CLEWELL, D.B. Nucleotide Sequence of the Gelatinase Gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, 59, 415-420, 1991.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S. AND WANNAMAKER, L.W., Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, 40, 722-756, 1976.
- TESHIMA, E. Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos, Universidade Federal de Viçosa, 2001, 113p. (Tese Doutorado).

- TOURÉ, R., KHEADR, E., LACROIX, C., MORONI, O. AND FLISS, I Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, 95, 1058-1069, 2003
- VASILJEVIC, T. AND SHAH, N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, 18, 714– 728, 2008.
- VÁSQUEZ, A., MOLIN, G., PETTERSSON, B., ANTONSSON, M. AND AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology** 28, 430-441, 2005.
- VAUGHAN, E.E., MOLLET, B. AND DEVOS. W.M. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. **Current Opinion in Biotechnology**, 58, 505–510, 1999.
- VERDENELLI, M.C, GHELFI, F., SILVI, S., ORPIANESI, C., CECCHINI, C. AND CRESCI, A. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. **European Journal of Nutrition**, 1-9, 2009.
- VERHEUL, A., RUSSELL, N.J., HOF, R.V., ROMBOOTS, F.M. AND ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 3451-3457, 1997.
- VESTERLUND, S., VANKERCKHOVEN, V., SAXELIN, M., GOOSSENS, H., SALMINEM, S. AND OUWEHAND, A.C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, 116, 325–331, 2007.
- VILJANEN, M., SAVILAHTI, E., HAAHTELA, T., JUNTUNEN-BACKMAN, K., KORPELA, R., POUSSA, T., TUURE, T. AND KUITUNEN, M. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allergy**, 60, 494–500, 2005.
- VINDEROLA, C.G. AND REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, 36, 895–904, 2003.

- WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. AND POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73, 451–455, 2001.
- WONG, H.C. AND CHEN, Y.L. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 54, 2179-2184, 1988.
- ZARATE, G., PEREZ-CHAIA, A., GONZALEZ, S. AND OLIVER, G. Viability and B galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. **Journal of Food Protection** 63, 1214–1221,2000.
- ZARAZAGA, M., SAINZ, Y., PORTILLO, A., TENORIO, C., RUIZ-LARRARA, R.F., CAMPO, R.DEL., BAQUERO, F. AND TORRES, C. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43, 3039– 3041, 1999.
- ZHOU, J.S., PILLIDGE, C.J., GOPAL, P.K. AND GILL, H.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, 98, 211–217, 2005.

APÊNDICE

Quadro 1- Dados de absorvância (600 nm) obtidos na curva de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37 °C

Isolados	Repetição	Controle	Oxgall
UFVCC1135	1	0,49	0,25
	2	0,62	0,34
UFVCC1136	1	0,31	0,16
	2	0,64	0,34
UFVCC1137	1	0,45	0,30
	2	0,73	0,38
UFVCC1138	1	0,39	0,16
	2	0,77	0,38
UFVCC1139	1	0,55	0,28
	2	0,70	0,42
UFVCC1140	1	0,51	0,25
	2	0,70	0,43
UFVCC1141	1	0,61	0,29
	2	0,72	0,38
UFVCC1142	1	0,36	0,16
	2	0,59	0,32
UFVCC1143	1	0,43	0,18
	2	0,47	0,34
UFVCC1144	1	0,63	0,33
	2	0,56	0,43
UFVCC1145	1	0,61	0,40
	2	0,51	0,39
UFVCC1146	1	0,55	0,31
	2	0,56	0,43
UFVCC1147	1	0,61	0,32
	2	0,84	0,48
UFVCC1148	1	0,63	0,38
	2	0,76	0,39
UFVCC1149	1	0,56	0,30
	2	0,63	0,34
UFVCC1150	1	0,59	0,34
	2	0,71	0,37
UFVCC1151	1	0,55	0,30
	2	0,68	0,33
UFVCC1152	1	0,63	0,28
	2	0,75	0,47
UFVCC1153	1	0,75	0,43
	2	0,81	0,52

Continua ...

Quadro 1A (Continuação)- Dados de absorbância (600 nm) obtidos na curva de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37 °C

Isolados	Repetição	Controle	Oxgall
UFVCC1154	1	0,80	0,41
	2	1,02	0,60
UFVCC1155	1	0,74	0,43
	2	0,69	0,46
UFVCC1156	1	0,68	0,45
	2	0,76	0,54
UFVCC1157	1	0,67	0,34
	2	0,80	0,50
UFVCC1158	1	0,65	0,35
	2	0,81	0,50
UFVCC1159	1	0,57	0,30
	2	0,76	0,45
UFVCC1160	1	0,65	0,32
	2	0,71	0,42
UFVCC1161	1	0,68	0,34
	2	0,72	0,47
UFVCC1162	1	0,60	0,23
	2	0,63	0,40
UFVCC1163	1	0,51	0,34
	2	0,73	0,47
UFVCC1164	1	0,59	0,20
	2	0,73	0,51
UFVCC1165	1	0,50	0,18
	2	0,75	0,56
UFVCC1166	1	0,43	0,28
	2	0,75	0,60
UFVCC1167	1	0,59	0,11
	2	0,76	0,60
UFVCC1168	1	0,62	0,09
	2	0,83	0,53
UFVCC1169	1	0,62	0,34
	2	0,89	0,53
UFVCC1170	1	0,62	0,11
	2	0,90	0,51
UFVCC1171	1	0,63	0,09
	2	0,92	0,50
UFVCC1172	1	0,60	0,10
	2	0,93	0,52

Continua ...

Quadro 1A (Continuação)- Dados de absorbância (600 nm) obtidos na curva de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37 °C

Isolados	Repetição	Controle	Oxgall
UFVCC1173	1	0,55	0,10
	2	0,62	0,10
UFVCC1174	1	0,63	0,11
	2	0,60	0,11
UFVCC1175	1	0,59	0,10
	2	0,56	0,08
UFVCC1176	1	0,61	0,11
	2	0,59	0,09
UFVCC1177	1	0,61	0,09
	2	0,60	0,10
UFVCC1178	1	1,45	1,06
	2	1,41	1,02
UFVCC1179	1	1,08	0,51
	2	0,89	0,48
UFVCC1180	1	1,07	0,49
	2	0,94	0,44
UFVCC1181	1	1,08	0,37
	2	0,98	0,56
UFVCC1182	1	1,02	0,46
	2	0,93	0,53
UFVCC1183	1	1,03	0,54
	2	0,09	0,43
UFVCC1184	1	1,03	0,46
	2	0,92	0,39
UFVCC1185	1	0,99	0,42
	2	0,91	0,48
UFVCC1186	1	1,07	0,48
	2	0,95	0,46
UFVCC1187	1	1,10	0,47
	2	0,94	0,46
UFVCC1188	1	1,02	0,40
	2	0,92	0,43
UFVCC1189	1	0,95	0,45
	2	0,88	0,38
UFVCC1190	1	1,01	0,46
	2	0,91	0,44
UFVCC1191	1	0,98	0,40
	2	0,89	0,39

Continua ...

Quadro 1A (Continuação)- Dados de absorbância (600 nm) obtidos na curva de crescimento dos isolados de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37 °C

Isolados	Repetição	Controle	Oxgall
UFVCC1192	1	0,90	0,24
	2	0,82	0,41
UFVCC1193	1	0,80	0,48
	2	0,80	0,36
UFVCC1194	1	1,00	0,43
	2	0,92	0,45
UFVCC1195	1	1,02	0,24
	2	0,93	0,44
UFVCC1196	1	1,05	0,41
	2	0,93	0,48
UFVCC1197	1	1,15	0,46
	2	0,77	0,39
UFVCC1198	1	0,78	0,42
	2	0,91	0,40
UFVCC1199	1	1,15	0,54
	2	0,99	0,52
UFVCC1200	1	0,85	0,39
	2	0,93	0,47

Quadro 2- Dados da sobrevivência dos isolados de *Lactobacillus* spp. em suco gástrico artificial (pH 2,0), expresso em Log UFC mL⁻¹, após 90 minutos

Isolados	repetição	tempo 0	tempo 15'	tempo 30'	tempo 60'	tempo 90'
UFVCC1135	1	7,36	7,29	7,15	6,11	6,88
	2	7,59	7,46	7,46	7,41	7,48
UFVCC1136	1	7,15	7,32	7,20	6,88	6,81
	2	7,58	7,49	7,46	7,53	7,38
UFVCC1137	1	7,38	7,48	7,36	7,04	6,97
	2	7,56	7,57	7,45	7,49	6,43
UFVCC1138	1	7,15	7,18	7,08	6,45	6,53
	2	7,41	7,36	7,38	6,49	6,30
UFVCC1139	1	7,28	7,26	7,08	6,94	6,15
	2	7,30	7,43	7,34	7,38	7,34
UFVCC1140	1	7,30	7,18	7,04	6,98	6,18
	2	7,41	7,49	7,48	7,54	7,52
UFVCC1141	1	7,34	7,43	7,40	7,45	7,30
	2	7,43	7,59	7,64	7,57	7,58
UFVCC1142	1	7,23	7,20	7,28	7,11	7,08
	2	7,60	7,63	7,62	7,54	7,60
UFVCC1143	1	7,32	7,23	7,34	7,30	6,95
	2	7,45	7,51	7,48	7,49	7,45
UFVCC1144	1	7,26	7,20	7,28	7,26	7,18
	2	7,51	7,48	7,57	7,49	7,20
UFVCC1145	1	7,34	7,36	7,36	7,04	7,23
	2	7,52	7,51	7,56	7,58	7,58
UFVCC1146	1	7,34	7,15	7,28	7,23	6,93
	2	7,54	7,49	7,52	7,41	7,28
UFVCC1147	1	7,08	7,15	6,91	7,00	6,88
	2	7,28	7,15	6,61	6,57	6,34
UFVCC1148	1	7,15	7,20	7,23	7,08	6,93
	2	7,45	7,41	6,65	6,04	6,83
UFVCC1149	1	7,40	7,26	7,38	7,45	7,23
	2	7,36	7,26	7,26	7,04	6,81
UFVCC1150	1	7,41	7,48	7,49	7,41	7,36
	2	7,46	7,30	6,08	6,28	6,00
UFVCC1151	1	7,30	7,15	7,04	6,32	6,00
	2	7,38	7,46	7,28	7,23	6,69
UFVCC1152	1	7,20	7,18	6,74	6,94	5,49
	2	7,34	7,32	7,36	7,20	7,08
UFVCC1153	1	7,36	7,40	7,30	7,30	6,99
	2	7,34	7,30	7,30	7,38	7,32
UFVCC1154	1	7,40	7,23	7,49	7,46	7,08
	2	7,36	7,41	7,43	7,36	7,30

Continua ...

Quadro 2A (Continuação)- Dados da sobrevivência dos isolados de *Lactobacillus* spp. em suco gástrico artificial (pH 2,0), expresso em Log UFC mL⁻¹, após 90 minutos

Isolados	Repetição	tempo 0	tempo 15'	tempo 30'	tempo 60'	tempo 90'
UFVCC1155	1	7,40	7,30	6,98	7,23	7,20
	2	7,43	7,51	7,40	7,45	6,93
UFVCC1156	1	7,38	7,43	7,30	6,93	6,46
	2	7,45	7,20	7,51	7,34	7,36
UFVCC1157	1	7,36	7,30	7,28	7,04	6,93
	2	7,38	7,41	7,36	7,40	7,18
UFVCC1158	1	7,38	7,23	6,26	6,30	5,97
	2	7,34	6,82	7,08	6,92	7,00
UFVCC1159	1	7,20	7,00	6,91	6,45	6,15
	2	7,36	7,40	7,32	7,08	7,08
UFVCC1160	1	7,26	7,38	7,46	7,49	7,49
	2	6,66	6,79	6,65	6,18	5,65
UFVCC1161	1	7,38	7,43	7,26	7,26	7,32
	2	7,49	7,54	7,52	7,49	7,41
UFVCC1162	1	6,64	7,28	7,26	6,74	7,30
	2	7,18	6,98	6,58	6,38	6,28
UFVCC1163	1	7,20	7,04	6,76	6,41	6,41
	2	7,40	7,38	7,36	6,91	7,40
UFVCC1164	1	7,46	7,26	7,41	7,36	7,26
	2	7,29	7,04	5,70	5,86	6,04
UFVCC1165	1	7,40	7,30	7,38	7,23	7,32
	2	7,04	6,86	6,63	6,40	6,32
UFVCC1166	1	7,34	7,34	7,28	7,15	7,30
	2	7,32	6,93	6,53	6,32	6,18
UFVCC1167	1	7,45	7,41	7,15	6,51	6,26
	2	7,23	6,95	6,36	5,95	5,85
UFVCC1168	1	7,45	7,49	7,51	7,48	7,41
	2	6,30	6,92	7,08	6,88	6,92
UFVCC1169	1	7,46	7,45	7,41	7,40	7,26
	2	7,32	7,15	6,92	6,63	6,98
UFVCC1170	1	6,62	6,46	6,53	5,85	5,30
	2	7,38	7,41	7,41	7,32	7,18
UFVCC1171	1	7,52	7,47	7,52	7,49	7,51
	2	7,28	7,08	6,38	7,11	7,30
UFVCC1172	1	7,23	7,48	7,49	7,41	7,18
	2	7,36	7,04	7,00	7,08	7,08
UFVCC1173	1	7,52	7,38	3,08	1,18	0,98
	2	7,32	7,46	5,97	3,00	2,30
UFVCC1174	1	7,32	7,52	7,29	3,11	2,40
	2	7,59	7,40	2,00	0,54	0,48

Quadro 2A (Continuação): Dados da sobrevivência dos isolados de *Lactobacillus* spp. em suco gástrico artificial (pH 2,0), expresso em Log UFC mL⁻¹, após 90 minutos.

Isolados	Repetição	tempo 0	tempo 15'	tempo 30'	tempo 60'	tempo 90'
UFVCC1175	1	7,61	7,57	2,55	0,65	0,65
	2	7,56	4,30	1,32	0,00	0,00
UFVCC1176	1	7,69	7,54	0,00	0,48	0,00
	2	7,34	7,46	6,29	3,20	2,69
UFVCC1177	1	7,46	7,49	3,38	2,75	2,36
	2	7,65	7,57	2,18	0,85	0,70
UFVCC1178	1	7,18	7,20	6,65	4,11	0,98
	2	7,48	7,46	6,68	2,94	2,56
UFVCC1179	1	7,26	3,30	0,00	0,78	0,00
	2	7,43	7,32	2,30	0,00	0,00
UFVCC1180	1	7,26	6,61	2,81	1,66	0,00
	2	7,20	7,20	4,54	0,48	0,18
UFVCC1181	1	7,46	5,79	2,18	1,82	0,00
	2	7,34	6,80	2,30	0,00	0,00
UFVCC1182	1	6,92	5,88	3,32	0,78	0,00
	2	7,28	7,00	0,00	0,00	0,00
UFVCC1183	1	7,08	4,49	0,00	1,49	0,00
	2	7,34	6,98	4,75	1,10	0,40
UFVCC1184	1	7,41	5,94	4,94	2,18	0,00
	2	7,32	7,34	3,26	0,00	0,00
UFVCC1185	1	7,20	5,18	2,48	1,32	0,00
	2	7,15	6,51	2,00	0,00	0,00
UFVCC1186	1	7,04	4,34	3,08	0,78	0,00
	2	7,15	6,89	2,60	0,30	0,18
UFVCC1187	1	7,18	5,32	0,00	1,32	0,00
	2	7,26	7,04	0,00	0,00	0,00
UFVCC1188	1	7,15	4,48	3,00	0,78	0,18
	2	7,30	6,81	2,18	0,00	0,30
UFVCC1189	1	7,11	5,54	2,81	1,66	0,00
	2	7,20	6,97	2,40	0,70	0,30
UFVCC1190	1	7,04	4,76	2,00	0,78	0,00
	2	7,28	6,97	2,18	0,30	0,00
UFVCC1191	1	7,28	6,30	6,15	2,60	0,00
	2	7,18	4,08	0,00	0,00	0,00
UFVCC1192	1	7,23	6,11	6,04	1,56	0,00
	2	7,26	6,92	0,00	0,18	0,00
UFVCC1193	1	7,38	7,23	5,43	1,20	0,00
	2	7,28	7,18	4,81	0,00	0,00

Continua ...

Quadro 2A (Continuação)- Dados da sobrevivência dos isolados de *Lactobacillus* spp. em suco gástrico artificial (pH 2,0), expresso em Log UFC mL⁻¹, após 90 minutos

Isolados	repetição	tempo 0	tempo 15'	tempo 30'	tempo 60'	tempo 90'
UFVCC1194	1	7,18	7,18	6,04	2,58	0,00
UFVCC1195	1	7,20	4,56	0,00	0,00	0,00
	2	7,23	7,23	0,00	0,18	0,00
UFVCC1196	1	7,20	7,23	5,60	2,80	0,00
	2	7,26	3,00	0,00	0,00	0,00
UFVCC1197	1	6,91	6,91	5,08	1,04	0,00
	2	7,30	4,08	2,00	0,65	0,00
UFVCC1198	1	7,18	7,08	5,15	2,48	0,00
	2	7,26	4,92	0,00	0,00	0,00
UFVCC1199	1	7,18	4,90	3,60	0,78	0,00
	2	7,15	4,62	0,00	0,00	0,00
UFVCC1200	1	7,32	7,32	5,30	4,11	0,00
	2	7,43	7,04	3,49	0,90	0,90

Quadro 3- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1135	1	3,8	0,0	0,0	0,0	1,3	0,9	2,8	1,5	3,8	2,8	2,9	3,6	3,7	1,3
	2	3,6	0,8	0,0	1,9	1,9	2,4	3,1	1,3	3,5	3,4	2,3	3,8	3,5	2,4
	3	3,7	0,9	2,4	0,0	1,3	1,9	3,0	0,0	3,7	3,0	1,8	4,0	3,7	2,7
UFVCC1136	1	4,0	1,1	1,1	2,3	1,0	2,3	3,2	1,2	3,5	3,5	2,5	3,5	3,7	2,4
	2	3,4	2,0	0,0	0,0	1,4	1,2	2,7	1,7	3,5	2,8	2,8	3,2	3,4	2,4
	3	3,7	1,0	0,0	0,0	1,7	1,7	3,0	2,5	4,0	2,8	2,5	3,5	3,6	1,9
UFVCC1137	1	3,6	1,0	0,0	1,5	2,1	1,9	2,9	2,4	3,8	3,5	2,4	3,7	3,8	2,5
	2	3,0	0,8	2,4	0,9	1,0	1,8	2,9	0,0	3,0	2,2	1,9	3,4	3,5	2,6
	3	3,5	2,4	0,0	1,9	0,0	1,9	2,9	0,0	3,8	3,0	2,3	3,8	3,5	2,7
UFVCC1138	1	3,3	1,5	1,6	1,6	1,9	1,2	2,3	2,0	3,1	2,7	1,5	3,0	2,5	2,7
	2	3,7	2,4	0,0	0,0	0,0	1,0	3,0	0,0	3,5	3,1	2,7	3,5	3,4	2,1
	3	3,5	1,0	0,0	2,8	1,5	0,9	2,9	1,6	3,7	3,0	2,8	3,5	3,2	2,1
UFVCC1139	1	3,6	0,0	2,4	0,0	1,4	2,1	3,1	1,2	3,7	2,6	1,9	3,9	3,7	2,8
	2	3,1	0,8	0,0	2,3	1,5	1,7	2,5	1,5	2,5	2,2	2,0	3,4	3,1	2,1
	3	3,7	1,0	0,0	1,1	2,6	2,7	2,6	1,2	3,7	2,0	2,0	3,7	3,4	2,3
UFVCC1140	1	3,7	2,5	0,0	2,4	1,2	2,0	3,0	0,0	3,6	3,1	2,1	4,0	3,8	2,3
	2	3,1	0,0	0,0	0,0	2,3	1,8	2,6	1,4	2,7	2,8	2,3	3,2	3,5	2,2
	3	3,5	1,1	2,6	0,0	2,0	1,3	3,1	0,9	3,4	3,0	2,0	3,4	3,3	2,2
UFVCC1141	1	4,2	2,0	1,1	2,5	1,7	1,5	3,4	1,5	4,0	3,5	3,1	4,3	4,2	2,3
	2	3,5	1,3	2,2	2,4	1,1	1,9	2,6	1,1	3,0	2,4	2,5	3,0	3,5	2,5
	3	3,4	2,6	1,0	1,1	1,3	0,9	1,3	1,7	3,4	3,0	2,7	3,4	3,7	2,4
UFVCC1142	1	4,0	0,0	0,0	0,0	2,5	2,0	3,7	1,5	4,0	3,4	3,1	4,0	4,0	3,0
	2	3,2	1,4	0,0	0,0	1,1	2,3	3,0	2,5	3,5	3,4	2,9	3,3	3,0	2,3
	3	3,5	1,4	1,3	2,9	1,5	2,2	2,8	0,0	3,7	2,8	3,0	3,7	3,4	1,8
UFVCC1143	1	3,7	2,1	0,0	0,0	0,0	1,1	2,8	0,0	3,6	3,5	2,9	3,9	4,0	2,6
	2	2,8	0,8	0,8	0,0	1,5	1,9	2,4	1,1	3,3	3,0	2,4	3,3	3,2	2,1
	3	3,6	1,0	0,0	0,0	2,4	1,8	3,0	1,8	4,0	2,8	2,1	3,5	4,0	2,0

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1144	1	3,3	0,9	0,0	0,0	1,4	1,3	2,3	1,4	3,1	2,2	1,8	3,1	3,2	2,4
	2	3,1	2,1	1,0	2,6	1,8	1,8	2,5	1,8	3,3	3,0	2,5	3,5	3,3	2,4
	3	3,5	1,1	0,0	0,0	2,3	1,8	3,0	3,0	3,3	3,3	2,2	3,9	3,5	2,6
UFVCC1145	1	4,0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,1	3,1	2,0	3,9	3,0	2,6	3,6	3,7	2,3
	2	3,3	0,0	0,0	0,0	2,0	1,7	2,9	1,3	3,3	3,1	2,6	3,4	3,4	2,1
	3	3,6	1,1	0,0	0,0	2,0	1,3	2,8	0,9	3,4	3,0	2,1	3,5	3,5	2,0
UFVCC1146	1	4,0	2,8	1,4	0,0	2,7	1,5	3,1	2,1	3,8	3,2	2,9	4,0	4,0	2,8
	2	4,1	0,0	0,0	2,0	1,6	0,9	3,0	0,0	3,6	2,5	2,6	3,7	3,4	2,5
	3	3,0	1,0	0,0	0,0	2,5	2,0	2,6	1,6	3,5	1,2	2,7	3,1	3,6	2,2
UFVCC1147	1	3,4	0,0	0,0	1,8	1,5	1,2	2,9	0,0	3,2	3,0	3,0	3,2	3,5	2,8
	2	3,5	1,8	0,0	1,7	1,7	1,7	2,0	0,0	3,0	2,4	2,4	3,4	3,5	2,2
	3	3,4	2,3	0,0	1,7	1,0	1,8	2,9	0,0	3,4	2,6	2,3	3,0	3,5	2,5
UFVCC1148	1	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	2,7	1,5	3,5	3,0	2,0	3,3	3,3	1,3
	2	4,0	0,0	0,0	2,8	1,1	0,9	3,0	0,0	3,4	2,6	2,8	3,2	2,4	2,2
	3	3,2	1,1	0,0	2,9	1,5	1,4	0,0	1,9	3,3	1,5	3,0	3,5	2,9	2,5
UFVCC1149	1	4,5	2,6	1,2	0,0	1,1	2,1	3,3	1,3	3,7	3,0	2,4	3,6	3,8	2,1
	2	3,7	0,8	0,0	0,0	1,6	0,9	2,8	1,1	3,5	2,9	2,1	3,4	3,7	1,5
	3	3,5	1,1	2,8	0,0	1,6	1,7	3,5	1,5	3,5	2,9	1,8	3,3	3,5	2,4
UFVCC1150	1	3,8	2,1	0,8	0,0	2,1	1,0	3,0	0,0	3,6	3,0	2,6	3,3	3,4	2,7
	2	3,2	1,1	2,1	1,9	1,4	1,3	2,9	0,7	3,5	2,7	2,4	3,5	3,7	2,5
	3	3,5	1,0	1,4	3,1	1,2	2,1	3,1	1,4	3,5	2,8	2,6	3,5	1,3	2,1
UFVCC1151	1	3,4	1,1	0,0	2,4	1,1	1,7	1,6	2,4	3,7	2,9	2,1	3,3	3,4	2,1
	2	3,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,2	2,5	0,0	3,1	2,4	2,1	3,5	3,1	2,1
	3	3,4	1,0	0,0	2,4	1,3	1,2	2,9	1,5	3,1	3,0	2,6	3,0	3,7	2,1
UFVCC1152	1	3,8	2,4	0,0	2,3	1,4	1,4	3,1	1,3	3,7	3,2	2,0	3,7	3,8	2,5
	2	3,6	2,3	1,5	2,3	1,7	1,6	2,6	1,3	3,6	2,8	2,1	3,3	3,0	2,1
	3	3,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,2	2,1	1,5	3,0	2,8	1,2	3,5	3,0	2,3

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG.

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1153	1	3,6	2,3	0,0	2,4	1,3	1,1	3,0	1,3	3,7	3,0	1,9	3,7	3,9	2,3
	2	3,7	1,0	0,0	2,7	1,4	2,0	1,1	1,7	3,4	2,0	1,9	3,4	3,2	2,1
	3	2,9	0,9	0,0	0,0	1,6	2,2	2,0	0,0	3,5	2,4	2,0	3,4	3,0	2,9
UFVCC1154	1	3,1	1,7	0,0	0,0	1,1	1,5	2,0	1,4	3,0	2,7	2,0	2,5	3,7	2,0
	2	3,0	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,0	0,0	3,0	2,6	1,9	2,4	2,7	2,2
	3	3,1	2,3	1,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	2,5	2,9	2,4	3,0	3,2	1,7
UFVCC1155	1	2,8	1,4	0,0	0,0	1,3	1,0	2,8	0,0	3,2	2,7	2,2	3,0	3,3	2,4
	2	2,9	0,8	2,1	1,6	0,0	1,5	2,1	0,0	3,2	2,8	2,0	3,2	3,0	2,1
	3	3,3	1,1	0,0	2,3	0,0	1,0	2,6	1,4	3,7	2,8	2,3	3,3	3,4	2,4
UFVCC1156	1	2,7	1,2	2,5	0,0	1,8	1,0	2,5	1,5	3,1	1,7	2,4	3,2	3,2	2,8
	2	2,7	1,2	0,0	2,1	1,8	1,5	2,4	1,1	3,0	2,3	2,2	3,1	3,4	2,0
	3	2,8	1,0	0,0	2,0	1,2	1,7	2,8	1,0	3,3	1,8	2,5	3,6	3,3	1,9
UFVCC1157	1	3,1	0,0	0,0	2,3	1,0	1,1	3,0	1,2	3,0	2,2	2,0	3,2	3,4	2,3
	2	2,7	1,7	1,2	1,4	1,2	1,7	2,8	0,7	3,5	2,4	2,0	3,1	3,1	2,0
	3	3,0	0,9	0,0	2,0	1,3	1,5	2,3	1,4	3,0	2,3	2,3	3,3	2,0	2,4
UFVCC1158	1	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	2,4	0,0	3,1	2,7	2,4	2,9	3,3	1,6
	2	3,3	0,0	0,0	2,1	0,9	1,0	2,6	0,0	3,2	2,4	2,1	3,0	3,0	2,2
	3	3,6	1,0	0,0	0,0	1,3	2,3	2,5	2,2	3,4	2,5	2,5	3,5	3,2	2,4
UFVCC1159	1	3,2	0,0	1,6	2,1	1,0	1,1	2,9	0,7	3,1	2,9	2,1	3,5	2,6	2,0
	2	3,1	1,5	0,8	2,0	1,4	1,3	2,6	2,1	3,0	2,8	2,4	3,1	3,5	2,3
	3	3,4	2,2	0,0	0,0	1,3	1,6	2,5	0,0	2,5	1,5	1,7	3,2	3,4	2,4
UFVCC1160	1	3,2	0,0	0,8	0,0	1,4	1,2	2,7	1,0	3,4	2,6	2,0	2,9	3,0	2,0
	2	3,4	0,0	0,0	0,0	1,6	1,0	2,4	2,2	2,3	2,6	2,4	3,0	3,2	1,9
	3	3,1	2,0	0,0	0,0	1,1	1,0	2,5	0,0	3,0	2,5	2,1	3,0	2,5	1,4
UFVCC1161	1	3,5	1,7	1,2	0,0	0,8	1,4	2,8	0,0	3,3	2,8	2,2	3,1	3,4	2,3
	2	3,1	0,9	2,3	0,9	1,6	1,3	2,5	1,4	3,3	1,4	2,1	3,0	3,0	2,4
	3	3,0	1,2	0,0	0,0	2,8	1,5	2,2	1,7	2,7	2,4	2,2	3,2	1,5	1,5

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1162	1	3,5	1,5	1,1	2,3	1,7	1,0	2,9	2,5	3,0	2,8	2,0	3,1	3,0	2,5
	2	3,4	0,8	0,0	0,0	2,5	2,0	2,4	1,4	3,1	2,7	3,2	3,1	3,4	2,4
	3	3,3	2,3	0,0	0,0	1,7	1,3	2,0	0,0	2,8	1,7	2,0	3,7	3,5	2,0
UFVCC1163	1	3,3	1,1	2,3	0,0	0,0	1,0	2,7	0,0	3,8	3,0	2,7	3,3	3,5	2,4
	2	3,3	0,8	2,3	0,0	1,1	0,9	2,7	1,2	2,7	2,1	2,1	3,0	3,2	2,1
	3	3,5	1,0	2,0	0,0	1,6	1,1	2,5	0,0	3,0	1,4	2,4	3,4	3,0	2,3
UFVCC1164	1	3,5	1,7	0,0	1,8	0,0	0,9	2,5	0,0	3,6	1,9	2,5	3,2	3,5	2,6
	2	3,2	0,7	2,0	2,0	1,0	1,0	2,3	0,0	2,9	2,1	2,6	3,0	3,4	1,2
	3	2,9	1,1	0,0	0,0	2,4	2,3	2,4	1,2	3,0	2,5	1,8	3,1	3,0	2,5
UFVCC1165	1	3,3	0,8	0,0	2,3	1,6	2,0	2,9	1,6	2,2	2,6	1,7	3,3	3,7	2,3
	2	3,0	1,1	0,0	2,0	2,3	1,4	2,3	0,9	2,8	2,6	1,8	2,7	3,4	2,2
	3	3,4	1,0	0,0	2,5	1,6	1,6	2,8	0,0	2,8	2,5	1,9	3,2	3,4	2,6
UFVCC1166	1	3,0	2,4	1,6	1,3	1,5	1,2	2,7	1,1	3,2	2,2	2,4	3,2	3,2	1,9
	2	3,2	0,8	0,0	0,0	1,4	1,9	2,4	1,8	2,8	2,6	2,4	3,1	2,7	2,2
	3	3,1	2,0	2,2	0,0	1,9	0,8	1,7	1,2	3,8	2,4	2,4	3,0	3,0	0,0
UFVCC1167	1	3,2	0,0	0,0	0,0	0,9	1,6	2,8	0,0	2,9	2,6	1,8	3,0	3,2	2,1
	2	2,8	0,0	0,0	2,2	0,0	0,9	2,6	0,0	3,0	2,4	2,0	2,7	3,2	2,0
	3	3,3	1,2	0,0	0,0	1,4	2,6	2,6	1,5	3,0	2,5	2,0	3,4	3,2	1,7
UFVCC1168	1	3,3	1,0	2,1	0,0	1,0	1,4	2,3	1,7	3,0	2,7	1,6	2,6	3,0	2,5
	2	3,4	0,0	2,3	1,1	1,3	0,8	2,3	2,4	3,0	2,4	2,0	2,6	3,0	2,5
	3	3,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,1	2,6	2,1	3,2	2,8	2,0	3,2	3,0	2,6
UFVCC1169	1	3,5	2,3	1,3	0,0	0,0	1,4	2,9	0,0	3,0	2,7	1,8	3,1	3,3	2,0
	2	3,0	2,2	0,0	0,0	0,0	1,8	2,6	0,0	3,1	2,7	2,5	3,6	3,7	2,0
	3	3,0	0,9	2,1	0,0	0,0	1,0	2,1	1,4	3,1	2,5	2,1	3,2	2,6	2,1
UFVCC1170	1	3,2	1,3	2,0	1,4	1,3	0,9	2,3	1,7	3,2	2,3	1,3	2,9	3,0	2,9
	2	2,8	2,1	0,0	0,0	1,5	1,4	2,9	1,8	3,3	2,5	2,4	3,3	2,7	1,9
	3	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	2,5	0,0	3,3	2,5	1,9	3,1	2,6	2,0

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1171	1	3,1	0,0	1,6	1,3	1,5	0,9	2,5	1,9	3,6	2,5	2,0	3,0	3,2	2,8
	2	3,0	2,5	0,0	0,0	1,5	1,0	2,6	1,3	3,1	2,5	2,0	2,7	2,9	1,5
	3	3,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,9	2,8	0,0	2,8	2,4	1,7	3,0	2,9	2,6
UFVCC1172	1	3,5	0,0	1,7	0,0	1,3	1,6	2,3	1,9	3,3	2,5	1,6	2,9	2,8	3,0
	2	2,8	0,9	0,0	0,0	2,1	1,5	2,2	1,6	2,7	1,5	1,8	2,9	3,0	1,5
	3	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	2,6	3,1	2,0	3,0	2,5	1,5
UFVCC1173	1	3,2	0,8	1,5	2,4	1,7	0,6	2,6	2,1	3,4	2,7	1,6	3,2	2,4	2,7
	2	3,0	1,1	2,0	0,0	1,5	1,7	2,3	2,1	3,1	2,4	1,8	1,8	2,7	1,7
	3	3,2	0,0	1,3	0,0	1,1	0,0	2,5	2,1	3,2	2,5	1,8	2,9	3,0	2,6
UFVCC1174	1	3,4	0,9	2,1	0,0	1,7	1,0	2,5	2,0	3,3	2,3	1,4	2,7	2,9	2,7
	2	3,0	1,4	2,3	0,0	1,4	1,0	2,5	2,3	2,8	2,3	1,1	2,2	2,5	2,8
	3	3,1	0,0	1,3	0,0	1,4	0,0	2,5	1,6	3,5	2,3	1,0	2,7	2,7	2,4
UFVCC1175	1	3,0	0,8	1,6	0,6	1,4	1,2	2,6	2,1	2,8	2,4	1,8	2,6	2,9	2,4
	2	3,1	1,8	1,4	0,0	1,4	1,4	2,3	1,5	2,8	2,3	1,2	2,6	2,7	2,7
	3	3,2	2,4	1,3	0,0	1,3	0,0	2,6	2,3	3,1	2,3	1,8	2,9	3,0	2,9
UFVCC1176	1	3,3	0,0	1,5	0,0	1,2	0,9	2,5	2,0	3,4	2,5	1,5	3,0	3,5	2,8
	2	2,7	1,0	1,8	0,0	1,4	1,8	2,5	2,2	3,3	2,7	1,3	2,4	2,3	2,8
	3	3,7	0,0	2,0	0,0	2,0	1,4	3,1	2,3	3,7	2,9	1,6	3,0	3,0	2,6
UFVCC1177	1	3,1	0,6	1,5	0,0	1,5	1,1	2,6	2,0	3,4	2,3	1,9	3,0	2,4	2,9
	2	3,0	1,7	2,0	1,4	1,6	1,0	2,3	1,9	3,0	2,4	1,5	2,4	2,7	2,3
	3	3,2	0,0	1,8	0,0	1,0	0,0	2,5	1,9	3,7	2,1	1,1	2,6	2,8	2,5

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1178	1	1,6	0,9	0,0	0,0	0,9	0,0	1,4	0,0	1,7	1,1	1,3	2,1	1,9	1,1
	2	1,9	0,8	0,0	0,0	1,1	0,0	2,1	0,0	1,9	1,8	1,5	1,3	1,4	2,0
	3	2,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	2,0	0,0	1,6	2,1	1,7	1,8	1,9	1,6
UFVCC1179	1	3,5	0,0	2,2	0,0	1,0	1,5	2,0	2,2	3,2	2,5	1,5	3,0	2,5	3,0
	2	3,3	0,0	1,5	0,0	0,0	1,0	2,2	1,9	2,7	2,4	2,4	2,0	2,5	2,9
	3	3,5	0,0	0,9	0,0	0,0	1,7	2,4	2,4	3,0	2,6	2,0	2,7	3,0	2,9
UFVCC1180	1	4,0	0,0	1,5	0,0	1,5	1,0	2,0	2,0	3,5	2,4	1,8	3,0	2,7	3,5
	2	3,3	1,0	1,2	0,0	0,0	0,0	2,5	2,0	3,0	2,3	1,8	2,0	2,8	3,0
	3	3,5	1,7	1,2	0,0	1,0	1,7	2,6	2,1	3,0	2,8	2,0	2,8	2,9	2,0
UFVCC1181	1	3,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0	2,5	2,0	3,5	2,5	1,6	2,5	3,0	3,0
	2	3,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	2,4	1,8	3,0	2,3	1,8	2,8	2,1	2,5
	3	3,0	1,6	1,3	0,0	1,1	1,7	2,3	2,0	3,5	2,6	1,6	2,6	2,9	2,3
UFVCC1182	1	3,5	2,0	2,0	0,0	0,0	1,1	2,7	2,0	3,5	2,2	1,8	2,8	3,0	3,5
	2	3,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,3	1,9	3,0	1,5	2,0	2,0	3,0	2,6
	3	3,0	0,0	1,4	0,0	1,0	0,9	2,7	2,0	3,3	2,4	2,0	2,5	3,2	2,6
UFVCC1183	1	3,5	0,0	2,0	0,9	1,0	0,0	2,5	2,0	3,0	2,5	2,8	2,5	3,8	3,8
	2	2,8	1,5	1,8	0,0	0,0	0,0	2,1	2,0	2,9	2,7	2,2	2,4	2,4	2,5
	3	3,0	2,1	1,3	1,3	2,1	0,0	2,4	2,3	3,4	2,6	1,5	2,8	3,0	2,8
UFVCC1184	1	3,4	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	2,3	2,5		2,2	1,5	2,0	2,8	3,0
	2	3,5	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	2,3	2,0	2,7	2,6	2,0	2,6	2,5	2,5
	3	3,6	1,1	2,3	1,4	1,2	1,1	2,8	2,2	3,2	2,2	2,2	2,9	3,7	2,8
UFVCC1185	1	3,2	1,1	1,7	0,0	1,1	1,0	2,3	2,0	3,5	2,5	2,0	2,5	3,0	4,0
	2	3,0	0,0	1,2	1,2	1,6	1,0	2,0	1,9	3,0	2,5	1,8	2,5	2,2	3,0
	3	3,3	1,3	1,4	1,1	1,3	1,0	2,4	2,0	0,1	2,5	1,8	2,4	3,1	2,8
UFVCC1186	1	2,8	0,0	1,9	0,0	1,0	0,0	2,0	2,0	3,5	2,2	1,7	2,5	3,5	3,5
	2	3,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	2,2	1,9	2,8	2,0	2,0	2,0	2,5	3,0
	3	3,0	0,0	1,5	1,8	1,3	1,4	2,3	2,3	3,1	2,5	2,2	2,5	3,4	2,6

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

Isolado	Repetição	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1187	1	4,0	0,0	2,0	0,0	2,0	0,0	2,5	2,2	3,2	2,5	1,8	2,5	2,5	3,0
	2	3,0	0,0	1,3	1,2	1,2	0,0	2,2	1,9	3,2	2,0	2,0	2,5	2,2	3,0
	3	3,1	0,9	1,7	1,0	1,2	0,9	2,7	2,1	2,8	2,5	1,5	2,8	3,5	3,0
UFVCC1188	1	4,0	0,0	2,0	0,0	1,2	0,0	2,5	2,0	3,5	2,3	2,5	2,5	2,6	3,0
	2	3,0	0,0	1,8	0,0	1,2	0,0	2,5	2,4	3,0	2,3	2,2	2,7	3,0	2,7
	3	3,3	0,0	1,2	1,0	1,5	1,2	2,4	2,2	3,1	2,0	1,8	3,2	3,2	2,7
UFVCC1189	1	3,0	0,0	1,5	0,0	1,2	0,0	2,5	2,0	3,5	2,5	2,0	2,4	2,8	3,0
	2	3,0	0,0	1,5	1,1	0,0	0,0	2,0	2,2	3,0	2,3	1,5	2,2	2,3	2,5
	3	3,1	1,4	2,5	1,4	1,3	0,9	2,5	2,3	3,2	2,7	1,4	2,5	3,0	2,7
UFVCC1190	1	3,5	0,0	1,0	0,0	1,2	0,0	2,0	2,0	3,6	2,2	1,7	1,5	2,5	3,5
	2	3,5	0,0	1,5	0,0	1,2	0,0	2,2	1,4	3,0	2,0	1,3	2,2	2,0	3,0
	3	3,2	1,5	1,8	1,1	1,0	0,0	2,3	1,7	3,1	2,6	1,5	2,6	2,6	2,6
UFVCC1191	1	3,0	0,0	1,0	0,0	1,2	0,0	2,2	1,8	3,8	2,5	1,5	2,2	2,0	3,0
	2	2,7	1,4	1,5	0,0	1,2	0,0	2,0	2,0	3,0	2,1	1,7	2,2	2,1	3,0
	3	3,0	1,3	1,7	0,0	1,4	1,7	1,6	1,8	3,3	2,2	1,7	2,8	2,9	2,3
UFVCC1192	1	4,0	0,0	1,0	0,0	1,2	0,0	2,2	1,8	3,3	2,5	2,0	2,0	2,5	3,0
	2	3,4	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	2,2	2,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,5
	3	3,2	0,0	1,4	1,8	1,2	1,1	2,3	1,9	3,1	2,1	2,2	2,6	2,8	2,7
UFVCC1193	1	4,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0	1,8	2,2	3,0	1,5	1,6	2,0	2,5	3,8
	2	3,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	2,3	1,8	2,6	2,0	1,5	2,2	2,4	2,0
	3	3,2	0,0	1,1	0,0	1,0	1,1	2,2	1,8	3,2	2,1	2,4	2,3	2,6	2,8
UFVCC1194	1	3,0	0,0	1,5	0,0	1,0	0,0	2,0	2,0	3,4	3,0	2,0	1,8	3,0	3,0
	2	3,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	2,1	2,0	3,0	2,2	2,0	2,2	2,2	2,8
	3	3,1	0,9	1,4	0,0	1,1	1,1	2,8	1,9	2,9	2,7	1,5	2,5	2,7	2,4
UFVCC1195	1	3,0	0,0	1,4	1,4	1,5	0,0	2,5	2,1	3,0	2,0	1,7	2,5	3,8	3,0
	2	3,0	2,0	1,7	1,1	0,0	0,0	2,2	2,0	3,0	2,4	2,2	2,0	2,2	2,6
	3	3,3	1,0	1,3	1,4	1,3	1,9	2,4	2,1	2,9	2,6	2,0	2,6	2,5	2,9

Continua ...

Quadro 3A (Continuação)- Dados da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Lactobacillus* spp. a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG

UFVCC1196	1	2,8	0,0	1,0	0,0	0,0	1,5	2,0	2,0	3,5	2,0	2,5	2,2	3,0	2,8
	2	3,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	3,5	2,2	2,0	2,2	2,5	2,5
	3	3,0	0,0	1,2	0,0	1,3	1,1	2,6	1,8	3,1	2,5	1,2	2,7	3,0	3,0
UFVCC1197	1	3,5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	2,4	2,0	3,0	2,4	1,5	2,5	2,6	3,5
	2	3,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	2,1	1,9	3,1	1,7	1,6	2,0	2,2	2,7
	3	3,1	0,0	2,3	0,0	1,3	0,0	2,3	2,1	3,0	2,3	1,6	2,3	2,8	2,9
UFVCC1198	1	3,0	0,0	1,4	1,5	0,0	0,0	2,5	2,0	4,4	2,5	2,4	2,5	3,0	3,4
	2	2,8	0,0	1,6	1,5	0,0	0,0	2,0	1,8	3,2	2,0	1,4	2,2	2,5	3,0
	3	3,1	1,4	1,5	0,0	1,5	0,9	2,5	1,7	3,1	2,0	1,2	2,2	2,7	2,3
UFVCC1199	1	3,5	0,0	1,0	0,0	1,5	0,0	2,5	2,2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,2	3,4
	2	3,0	0,0	1,5	0,0	1,5	0,0	2,1	1,9	3,2	2,0	2,2	2,2	2,5	2,8
	3	3,2	1,0	1,2	1,2	1,3	0,0	2,3	2,0	3,0	2,3	1,8	2,7	3,0	3,0
UFVCC1200	1	3,0	0,0	1,1	1,1	0,0	0,0	2,7	2,1	3,2	2,5	2,0	2,5	3,8	3,2
	2	3,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	1,8	2,0	3,0	2,0	1,9	2,6	2,2	3,0
	3	3,1	0,0	1,9	1,6	1,3	0,0	2,4	1,9	3,1	2,4	2,2	2,6	3,0	2,5

Quadro 4- Dados do antagonismo dos isolados de *Lactobacillus* spp. sobre patógenos pelo método *spot* em meio tamponado ou não

Isolados	SPOT				SPOT em meio tamponado			
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
UFVCC1135	+	+	+	+	+	+	+	-
UFVCC1136	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1137	+	+	+	+	+	-	+	+
UFVCC1138	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1139	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1140	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1141	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1142	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1143	+	+	+	+	+	+	+	-
UFVCC1144	+	+	+	+	+	+	+	-
UFVCC1145	+	+	+	+	+	+	+	-
UFVCC1146	+	-	+	-	+	-	+	-
UFVCC1147	+	+	+	-	+	-	+	-
UFVCC1148	+	+	+	-	+	-	+	-
UFVCC1149	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1150	+	-	+	-	+	-	-	-
UFVCC1151	+	+	+	-	-	+	-	-
UFVCC1152	+	-	+	+	-	-	+	-
UFVCC1153	+	-	+	-	+	-	+	-
UFVCC1154	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1155	+	+	+	-	+	+	+	-

Continua ...

Quadro 4A (Continuação)- Dados do antagonismo dos isolados de *Lactobacillus* spp. sobre patógenos pelo método *spot* em meio tamponado ou não

Isolados	SPOT				SPOT em meio tamponado			
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
UFVCC1156	+	+	+	-	+	+	+	-
UFVCC1157	+	+	+	-	+	-	+	-
UFVCC1158	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1159	+	+	+	+	+	+	-	-
UFVCC1160	+	+	+	+	+	-	-	-
UFVCC1161	+	+	+	+	+	-	+	-
UFVCC1162	+	+	+	+	+	-	+	+
UFVCC1163	+	+	+	-	-	-	+	-
UFVCC1164	+	+	+	+	+	+	+	-
UFVCC1165	+	-	+	+	+	-	+	-
UFVCC1166	+	+	+	-	+	+	+	-
UFVCC1167	+	+	+	+	+	+	-	+
UFVCC1168	+	+	+	+	-	+	+	+
UFVCC1169	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1170	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1171	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1172	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1173	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1174	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1175	+	+	+	+	-	+	-	+
UFVCC1176	+	+	+	+	+	-	+	+

Continua ...

Quadro 4A (Continuação)- Dados do antagonismo dos isolados de *Lactobacillus* spp. sobre patógenos pelo método *spot* em meio tamponado ou não

Isolados	SPOT				SPOT em meio tamponado			
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
UFVCC1177	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1178	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1179	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1180	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1181	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1182	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1183	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1184	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1185	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1186	+	+	+	+	+	+	-	+
UFVCC1187	-	+	+	-	-	+	+	-
UFVCC1188	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1189	+	+	-	+	+	+	-	+
UFVCC1190	+	+	+	-	+	+	+	+
UFVCC1191	+	+	+	+	+	+	+	+
UFVCC1192	+	+	+	-	+	+	+	-
UFVCC1193	+	+	+	-	+	+	+	-
UFVCC1194	+	+	+	+	+	+	+	-

Continua ...

Quadro 4A (Continuação)- Dados do antagonismo dos isolados de *Lactobacillus* spp. sobre patógenos pelo método *spot* em meio tamponado ou não

Isolados	SPOT				SPOT em meio tamponado			
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
UFVCC1195	-	+	+	+	-	+	+	+
UFVCC1196	-	+	+	+	-	+	+	+
UFVCC1197	-	+	+	+	-	+	+	+
UFVCC1198	-	+	+	+	-	+	+	+
UFVCC1199	+	-	-	+	-	-	-	+
UFVCC1200	+	+	+	+	+	+	+	+