

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

**INFLUÊNCIA DO LEITE MATERNO SOBRE A POPULAÇÃO
DE *Lactobacillus* spp. NAS FEZES DE RECÉM-NASCIDOS**

CARLA CUNHA ROCHA

SÃO LUÍS

2018

CARLA CUNHA ROCHA

**INFLUÊNCIA DO LEITE MATERNO SOBRE A POPULAÇÃO
DE *Lactobacillus* spp. NAS FEZES DE RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

SÃO LUÍS

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA.

Cunha Rocha, Carla.

Influência do leite materno sobre a população de
Lactobacillus spp. nas fazas de recém-nascidos / Carla
Cunha Rocha. - 2018.

71 f.

Orientador(a): Valério Monteiro Neto.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ocbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2018.

1. Amamentação. 2. Lactobacillus. 3. Probióticos. 4.
Recém-nascido. I. Monteiro Neto, Valério. II. Título.

CARLA CUNHA ROCHA

**INFLUÊNCIA DO LEITE MATERNO SOBRE A POPULAÇÃO
DE *Lactobacillus* spp. NAS FEZES DE RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Cristina de Andrade Monteiro

Universidade Ceuma

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva

Universidade Federal do Maranhão

“Enquanto houver vontade de lutar
haverá esperança de vencer.”

Santo Agostinho

Dedico

Às pessoas que fizeram parte da minha formação pessoal, acadêmica e profissional: minha mãe Maria do Espírito Santo Cunha Rocha, minha irmã gêmea Carina Cunha Rocha e minha tia Maria Clarice Rocha (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Valério Monteiro Neto pela confiança e oportunidade de realização desta pesquisa, à minha coorientadora Prof. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim pela dedicação nos trabalhos cotidianos do laboratório.

À minha mãe, Maria do Espirito Santo Cunha Rocha, por ser meu porto seguro em todos os momentos desta longa caminhada e acreditar neste meu objetivo de vida desde o começo, à minha gêmea Carin Cunha Rocha, ao meu cunhado Márcio Geldo Silva Neves e ao meu companheiro Sérgio Antônio Leite Coelho pelo apoio e incentivo durante a realização deste estudo.

Aos colegas de laboratório Monique Santos do Carmo, Ennio Patrezzi da Silva Costa, Fernanda Carolina Morais Maia, Elka Priscila Moraes Lopes, Bruna de Oliveira de Melo, Lílya Xelle de Brito Rodrigues, Camila Itapary dos Santos e aos técnicos Mônica Cristina Pestana de Sousa e Hélio Euclides Silva dos Santos que contribuíram para a execução do trabalho.

Às enfermeiras do Banco de Leite do Hospital Universitário Materno Infantil Feliciano Santos Pinheiro, Jacqueline Martins Cantanhede, Francilidia Oliveira de Assunção pela parceria no recrutamento das mães participantes através do repasse de informações básicas sobre a pesquisa para posteriores abordagens nos domicílios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão pelo incentivo ao meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Laboratório de Biologia Parasitária do UNICEUMA pela oportunidade e apoio na infraestrutura para execução desta pesquisa.

À FAPEMA pelo apoio financeiro ao projeto.

À FIOCRUZ pelo fornecimento de materiais necessários ao progresso do trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 A importância do leite materno.....	16
2.2 Microbiota do leite humano	17
2.3 Colonização microbiana do trato gastrointestinal	20
2.4 O gênero <i>Lactobacillus</i>	21
2.5 Probióticos	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Critérios de inclusão para seleção de doadoras de leite e de recém-nascidos	28
4.2 Obtenção de amostras de leite humano.....	29
4.3 Coleta de amostras de fezes.....	30
4.4 Isolamento e contagem de colônias	30
4.5 Caracterização fenotípica presuntiva das bactérias lácticas.....	30
4.6 Identificação dos isolados por Espectrometria de Massa MALDI-TOF	31
4.7 Extração do material genético dos isolados para as análises moleculares.....	31
4.8 Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i> por PCR.....	32
4.8.1 Identificação das espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas das amostras avaliadas.....	32
4.8.2 Reação de sequenciamento para a confirmação da identidade das espécies de lactobacilos isolados das amostras de leite e fezes.....	33
4.8.2.1 Análise Computacional das sequências.....	33
4.9 Caracterização do potencial probiótico dos isolados de <i>Lactobacillus</i>	34
4.9.1 Ensaios de tolerância à lisozima, pH ácido e sais biliares	34
4.9.2 Adesão à mucina pelas espécies de <i>Lactobacillus</i>	34

4.9.3 Ensaio de antagonismo das espécies de <i>Lactobacillus</i> contra <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	35
4.10 Análises estatísticas.....	35
4.11 Questões éticas	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Características clínicas das mães e dos recém-nascidos	37
5.2 Identificação presuntiva dos isolados bacterianos	39
5.3 Determinação do número de bactérias viáveis.....	40
5.4 Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i> por PCR.....	42
5.5 Ensaios de tolerância à lisozima, pH ácido, sais biliares e ligação à mucina	43
5.6 Ensaio de antagonismo das espécies de <i>Lactobacillus</i> contra <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	49
Referências.....	50
ANEXOS.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
g	Gramas
h	Horas
min	Minutos
MRS _c	<i>Man Rogosa e Sharpe</i> com cisteína
mL	Mililitros
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potential do íon hidrogênio
PBS	Solução salina tamponada (do inglês: Phosphate-buffered saline)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ácido ribonucleico
TGI	Trato Gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colônias
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microbiota do leite materno segundo o período de lactação	19
Tabela 2: Tipos de infecções associadas às espécies de <i>Lactobacillus</i> Erro! Indicador não definido.	
Tabela 3: Características clínicas das mães e seus bebês (n=18 pares mãe-filho)	38
Tabela 4: Espécies de <i>Lactobacillus</i> identificadas nas fezes e no leite e submetidas aos ensaios de tolerância às condições do trato gastrointestinal.....	44
Tabela 5: Quantificação de colônias sugestivas de <i>Lactobacillus</i> spp. e relatados como Log10 de UFC / mL em amostras de leite e de fezes.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características morfológicas sugestivas para o gênero <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de amostras de leite e fezes após coloração pelo método de Gram	40
Figura 2: Características morfológicas das colônias de <i>Lactobacillus</i> após semeadura em ágar MRS para contagem de colônias	40
Figura 3: Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i> por PCR	42

RESUMO

Durante o aleitamento materno várias espécies de bactérias presentes no leite podem ser transmitidas ao recém-nascido. Entre estas bactérias, muitas espécies de *Lactobacillus* apresentam um papel relevante como probióticos e são consideradas importantes para a saúde da criança. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a influência do aleitamento materno na população fecal de *Lactobacillus* de recém-nascidos nos três períodos de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro), analisando o potencial probiótico de *Lactobacillus*. Dezoito mães e seus respectivos recém-nascidos foram selecionados para o estudo. Todos nasceram por parto normal e todas tiveram gestação a termo. Colônias bacterianas com características fenotípicas semelhantes à *Lactobacillus* tiveram o seu material genético extraído e submetido a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores para a região 16S rRNA específico para o gênero. Adicionalmente, reações de PCR com iniciadores específicos para a identificação dos isolados em nível de espécie foram utilizadas. No processo de isolamento bacteriano, as amostras fecais apresentaram as maiores contagens de *Lactobacillus* em comparação às do leite materno, independentemente do estágio de lactação. Espécies bacterianas, incluindo *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*, oriundas de fezes dos recém-nascidos e amostras de leite materno mostraram perfis de tolerância, quando submetidos aos testes do pH ácido, ação da lisozima e de sais biliares. Essas espécies foram capazes de se ligar à mucina e também apresentaram atividade antagonica contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Os resultados obtidos mostraram que as espécies bacterianas exibiram potencial probiótico. Além disso, observou-se que ocorreu a manutenção de *Lactobacillus* spp., na microbiota intestinal durante todos os estágios da lactação. A maior quantidade de *Lactobacillus* nas amostras fecais sugere que o trato intestinal representa um ecossistema adequado para colonização por *Lactobacillus*. Os resultados do estudo mostraram que a amamentação exclusiva é um fator importante para a transferência de bactérias do gênero *Lactobacillus* para os recém-nascidos.

Palavras-chave: *Lactobacillus*; Probióticos; Amamentação; Recém-nascido.

ABSTRACT

During breastfeeding several species of bacteria present in milk can be transmitted to the newborn. Among these bacteria, many species of *Lactobacillus* play a relevant role as probiotics and are considered important for the child's health. The objective of this study was to investigate the influence of breastfeeding on the fecal population of *Lactobacillus* of newborns in the three lactation periods (colostrum, transitional milk and mature milk), analyzing the probiotic potential of *Lactobacillus*. Eighteen mothers and their respective newborns were selected for the study. All were born by normal birth and all had full term gestation. Bacterial colonies with phenotypic characteristics similar to *Lactobacillus* had their genetic material extracted and submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers for the 16S rRNA region specific for the genus. In addition, PCR reactions with specific primers to identify species-level isolates were used. In the bacterial isolation process, the faecal samples had the highest *Lactobacillus* counts in comparison to the breast milk, regardless of the stage of lactation. Bacterial species, including *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus rhamnosus*, from faeces of the newborns and samples of breast milk showed tolerance profiles when submitted to acid pH, lysozyme and salts biliary. These species were able to bind to mucin and also presented antagonistic activity against Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). The results showed that the bacterial species exhibited probiotic potential. In addition, maintenance of *Lactobacillus* spp. Was observed in the intestinal microbiota during all stages of lactation. The greater amount of *Lactobacillus* in fecal samples suggests that the intestinal tract represents an ecosystem suitable for colonization by *Lactobacillus*. The results of the study showed that exclusive breastfeeding is an important factor for the transfer of bacteria of the genus *Lactobacillus* to the newborns.

Keywords: *Lactobacillus*; Probiotics; Breast-feeding; Newborn.

1 INTRODUÇÃO

O leite humano tem relevante importância na composição da microbiota intestinal dos recém-nascidos, visto que os diferentes microrganismos competem entre si à medida que muda o ambiente intestinal durante as fases da lactação (BÄCKHED et al., 2015).

Diante disso, os constituintes do leite materno (aminoácidos, oligossacarídeos, enzimas, ácidos graxos, anticorpos) adaptam-se às necessidades do lactente. Sendo o mesmo mais rico em proteínas, minerais, carotenoides e vitaminas lipossolúveis, principalmente as vitaminas A e E, na fase de produção do colostro que é secretado no último trimestre da gravidez e permanece até o final da primeira semana (ANVISA, 2008; COSTA, 2012). No leite de transição (de 7 a 14 dias após o parto) o teor de lipídeos, lactose e vitaminas hidrossolúveis (vitaminas do complexo B e vitamina C) fica mais elevado. O leite maduro (a partir de 14 dias após o parto) apresenta-se menos viscoso, mas contém os nutrientes (lactose, lipídeos, proteínas, aminoácidos) importantes para o desenvolvimento do recém-nascido (ANVISA, 2008; COSTA, 2012).

Acredita-se que a origem bacteriana no trato gastrointestinal do recém-nascido pode ser resultante da ingestão de microrganismos presentes na pele da mãe durante a amamentação e da existência de uma via que transporta espécies microbianas maternas diretamente para o leite (DONNET-HUGHES et al., 2010; HUNT et al., 2011).

No entanto, as intervenções como a cesariana, o uso de antibióticos e a alimentação artificial, alteram a microbiota infantil e podem ser fatores que modulam uma nova configuração da microbiota humana (HYDE e MODI, 2012). Dados epidemiológicos sugerem que essas intervenções no desenvolvimento da microbiota precoce estão relacionadas com patologias metabólicas (diabetes, obesidade) e imunológicas (esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico) (HYDE e MODI, 2012).

Diante disso, estratégias para prevenir a perturbação da microbiota infantil saudável e restaurá-la após as alterações devem ser pesquisadas para ajudar a conter as tendências epidêmicas de doenças metabólicas e imunes (MUELLER et al., 2015).

Nesse contexto, bactérias presentes no leite materno têm sido propostas como importantes grupos bacterianos com potencial probiótico. Os microrganismos probióticos podem ser utilizados com função primordial de restaurar a homeostase microbiana no organismo humano. (VANDENPLASA et al., 2015).

Para isso, algumas bactérias do trato gastrointestinal, entre as quais se destacam as do gênero *Lactobacillus*, têm sido propostas como probióticos, podendo ser utilizadas como alternativa na amenização ou prevenção de doenças infecciosas intestinais (diarreia, gastroenterites). Tal propriedade destes microrganismos tem sido objeto de vários estudos frente aos mais diversos patógenos. Algumas espécies de *Lactobacillus* já foram estudadas, porém, diante da diversidade do gênero, muitas necessitam ser avaliadas (VINDEROLA et al., 2002).

Portanto, a seleção de novas estirpes de *Lactobacillus* a partir de amostras de origem humana é de grande interesse, principalmente para o tratamento de doenças que apresentam elevados índices de morbidade e mortalidade (cólera, hepatites virais). A identificação de novas espécies a partir de pesquisas nacionais ajudaria a diminuir os custos, tornando-os mais acessíveis, além de elevar os indicadores de saúde no país (BRYCE et al., 2005).

A fim de isolar e identificar novas estirpes bacterianas com potencialidades probióticas sugere-se que os lactentes alimentados exclusivamente com leite materno nas três etapas de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro) apresentem as mesmas espécies de *Lactobacillus* nas fezes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância do leite materno

O leite materno é uma importante fonte de nutrição para o lactente, pois é composta por proteínas, gorduras e carboidratos, sendo o alimento essencial para o desenvolvimento do bebê. Protege contra doenças alérgicas, desnutrição, diabetes *mellitus*, doenças digestivas, obesidade, cáries. Crianças amamentadas tornam-se adultos com menor taxa de colesterol total, menor incidência de alteração da pressão arterial e reduzidas as prevalências de obesidade e diabetes do tipo dois (RAMOS et al., 2010).

O aleitamento materno exclusivo estabelece também o vínculo afetivo mãe-filho. Estudos relatam que a amamentação oferece benefícios para a lactante como menor incidência de câncer de mama e de ovário, recuperação do peso pré-gestacional e diminuição de fraturas causadas por osteoporose (COSTA, 2012).

O colostro geralmente varia de cor, indo do semelhante à água de coco ao amarelo-alaranjado. A coloração do leite de transição muda gradualmente em até duas semanas, para um branco opaco, até tornar-se leite maduro. A cor amarelada advém do pigmento β caroteno, que é lipossolúvel e as cores anormais podem ser desenvolvidos por crescimento microbiano, como a cor vermelha causada pela bactéria *Serratia marcescens* e a cor azul, pela bactéria do gênero *Pseudomonas* (ANVISA, 2008).

Além do valor nutricional, o leite humano possui fatores imunológicos que protegem a criança contra infecções. Os anticorpos IgA no leite humano são um reflexo dos antígenos entéricos e respiratórios da mãe. A concentração de IgA no leite materno diminui ao longo do primeiro mês até permanecer constante. Além da IgA, o leite materno contém outros fatores de proteção, tais como anticorpos IgM e IgG, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, lactoferrina lisozima e fator bífido. Esse favorece o crescimento do *Lactobacillus bifidus*, bactéria não patogênica que acidifica as fezes, dificultando a instalação de bactérias que causam diarreia, como *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. (BRASIL, 2015).

É importante notar que alguns fatores podem influenciar na composição do leite humano dentre eles, a individualidade genética, a alimentação materna e o período de lactação, havendo diferenças na concentração de nutrientes no colostro (secreção até 7 dias

após o parto), no leite de transição (de 7 a 14 dias após o parto) e no leite maduro (a partir de 14 dias após o parto) (ANVISA, 2008; COSTA, 2012).

2.2 Microbiota do leite humano

A fim de explicar os mecanismos que estabelecem o microbioma do leite humano, estudos têm considerado três importantes vertentes: alterações fisiológicas e hormonais na mãe durante e após a gravidez podem influenciar na permeabilidade do intestino, o que facilitaria a migração das bactérias do intestino para a glândula mamária através do fluxo retrógrado (estimulação do mamilo pela sucção); a microbiota da pele da mãe e a microbiota bucal do bebê podem contribuir para o estabelecimento do microbioma do leite humano; as bactérias originadas da pele e da cavidade bucal do lactante invadem a glândula mamária e se ligam às células imunes sem provocar uma resposta imunológica (HAGI et al., 2013; JEURINK et al., 2013).

Outros estudos têm demonstrado a diversidade de microrganismos no leite humano. Antes, a presença de gêneros como *Enterococcus* e *Staphylococcus* era considerada contaminação. Conforme mostra a Tabela 1, as pesquisas tendem a considerar essa presença como funcional a até mesmo indispensável para o desenvolvimento do trato gastrointestinal no recém-nascido (GONZAGA, 2017).

A microbiota do leite é predominantemente constituída por *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Acinetobacter* spp., mas o *Staphylococcus aureus* não foi detectado em amostras de mães saudáveis (BOIX-AMORÓS et al., 2016). Dessa forma, não há correlação entre a carga bacteriana e a quantidade de células imunológicas no leite, reforçando a ideia de que as bactérias do leite não são percebidas como uma infecção pelo sistema imunológico (BOIX-AMORÓS et al., 2016).

Em outro estudo, os gêneros mais abundantes no leite foram *Serratia* e *Corynebacteria*. A origem das bactérias que habitam o leite pode ser demonstrada a partir do fluxo retrógrado aos ductos mamários durante a sucção que fornece uma rota ideal para a troca de bactérias da boca do bebê na glândula mamária. (HUNT et al., 2011).

O leite materno contém *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que podem contribuir para o estabelecimento da microbiota no recém-nascido (SOLIS et al., 2010). Contagens totais de bactérias, incluindo *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp., aumentam ao longo do período de lactação (KHODAYAR-PARDO et al., 2014).

O leite materno é uma importante fonte de diversidade bacteriana para o intestino neonatal, incluindo microrganismos anaeróbios obrigatórios como *Propionibacterium*, que podem contribuir para maturação do sistema imune (JOST et al., 2013). Estirpes viáveis de anaeróbios obrigatórios associados ao intestino como as dos filos Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria são compartilhadas entre o ecossistema intestinal materno e neonato através da amamentação (JOST et al., 2014).

A colonização bacteriana no intestino do recém-nascido a partir do leite materno é composta por *Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp., *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Haemophilus* spp. e *Veillonella* spp. (BACKHED et al., 2015).

Tabela 1. Microbiota do leite materno segundo o período de lactação adaptado de GONZAGA (2017)

n	Parto	Fezes			Leite			Referência
		Colostro	Transição	Maduro	Colostro	Transição	Maduro	
40 (20+20)	normal	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Enterococcus</i> -	<i>Streptococcus</i> - <i>Bifidobacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> -	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> - <i>Staphylococcus</i>	SOLÍS et al. (2010)
16	não descrito				<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> <i>Corynebacteria</i>			HUNT et al. (2011)
14 (7+7)	normal				<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Propionibacterium</i>			JOST et al. (2013)
14 (7+7)	normal	Filos - Actinobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes, Proteobacteria			Filos - Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria			JOST et al. (2014)
64 (32+32)	normal e cesárea				<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i> spp			KHODAYAR-PARDO et al. (2014)
196 (98+98)	cesárea	<i>Enterobacter</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Veillonella</i>						BACKHED et al. (2015)
196 (98+98)	normal	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i>						
21	não descrito				<i>Staphylococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Finegoldia</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Gemella</i> .			BOIX-AMORÓS et al. (2016)

2.3 Colonização microbiana do trato gastrointestinal

O processo de colonização do trato gastrointestinal humano começa no nascimento e a partir desse momento diversas alterações são observadas. Crianças nascidas por parto normal apresentam microbiota com perfil diferente daquelas que nasceram por meio de cirurgia cesariana. A diferenciação também ocorre quando se consideram bebês nascidos a termo ou prematuros, bem como aqueles que se alimentam exclusivamente de leite materno ou fazem uso de fórmulas infantis ou outros alimentos (MATAMOROS et al., 2013).

Aspectos fisiológicos podem ser determinantes no processo de colonização, como o amadurecimento do processo de peristalse, a superfície do epitélio, a intensidade da secreção de muco, as condições de permeabilidade intestinal, a frequência do processo de translocação bacteriana e o estado do sistema imune da mucosa intestinal (FRANCE DE LA COCHETIERE et al., 2007).

Além desses fatores ambientais, nutricionais e fisiológicos, o desenvolvimento intestinal na vida intrauterina tem influência também de fatores genéticos. A presença de DNA bacteriano no cordão umbilical, líquido amniótico, placenta e no mecônio do recém-nascido sugere uma colonização intestinal pré-termo (AAGARD et al., 2014). Um estudo com 29 gestantes mostrou que o DNA bacteriano foi detectado em amostras de placenta no parto cesariana. O gênero *Lactobacillus* predominou em 100% das amostras, seguido de *Bifidobacterium* em 43% e de bacteroides em 34% das placentas (RAUTAVA et al., 2012). Essa exposição inicial de padrões moleculares bacterianos no feto tem o objetivo de preparar o sistema imunológico e o epitélio para responder aos patógenos e comensais após o nascimento (ABRAHAMSSON et al., 2015).

A translocação bacteriana até atingir a placenta e glândulas mamárias começa com o achado de material genético de bactérias entéricas maternas em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) no sangue e no leite de mulheres grávidas. As células dendríticas intestinais capturam ativamente bactérias do lúmen, transportam via sanguínea para as glândulas mamárias e placenta. Pode-se afirmar que através da translocação bacteriana durante a gravidez, seja fornecido à prole um microbioma pioneiro intra-uterino (PEREZ et al., 2007; ABRAHAMSSON et al., 2015).

Em um estudo metagenômico sobre a diversidade de bactérias do leite foram encontrados os filos mais dominantes sendo Proteobacteria e Firmicutes e em nível de gênero, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (URBANIAK et al, 2016).

Inicialmente, o trato gastrointestinal dos recém-nascidos é colonizado por microrganismos anaeróbios facultativos pertencentes à família das Enterobacteriaceae que consomem o oxigênio disponível no ambiente e liberam gás carbônico. Após a ocorrência da modificação na atmosfera, tem-se então um ambiente propício para o estabelecimento de espécies anaeróbias estritas, como *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Bacteroides* (JIMÉNEZ et al., 2008). Nos primeiros dias de vida o intestino possui diversidade microbiológica muito baixa, principalmente de espécies anaeróbias (ROUDIÈRE et al., 2009). Após determinado tempo os microrganismos estabelecem relação mútua com o hospedeiro e atingem a estabilidade (PALMER et al., 2007).

2.4 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* faz parte do grupo das bactérias lácticas que se caracterizam morfológicamente na forma de bastonete ou cocobacilos, apresentando uma parede celular externa rígida constituída por peptideoglicanos, ácidos teicóicos e lipoteicóicos que lhes conferem características de Gram-positivas. São catalase negativas, entretanto a atividade pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens. Não formam esporos e acumulam ácido láctico no ambiente de crescimento como produto do metabolismo primário, mas existem representantes heterofermentativos, que têm como resultado final a produção de lactato, dióxido de carbono e etanol em quantidades equimolares (FELIS e DELLAGLIO, 2007; BARBOSA et al., 2016)

Com isso, todos os componentes desse grupo são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como o trato intestinal. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos e quimio-organotróficos, requerendo meios enriquecidos para o crescimento: carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucléicos e vitaminas (FELIS e DELLAGLIO, 2007; BARBOSA et al., 2016).

O crescimento deste gênero pode ocorrer de 2°C a 53°C, com temperaturas ótimas de 30°C a 40°C. Com relação ao pH, o seu crescimento ocorre em valores $\text{pH} \leq 5$, sendo considerados acidúricos, com redução da sua taxa de crescimento em meios neutros e básicos (TRIPATHI; GIRI, 2014)

A ocorrência de bactérias láticas e, portanto, de *Lactobacillus*, em infecções oportunistas é muito rara. *Lactobacillus* têm sido citados na literatura como um organismo patológico na maioria dos casos de infecção em pessoas com sistema imunológico comprometido, incluindo aquelas com diabetes *mellitus* e neutropenia, pessoas submetidas à terapia imunossupressora e antibioticoterapia, bem como pacientes que foram submetidos a cirurgias recentes no trato gastrointestinal. *Lactobacillus casei* e *L. rhamnosus* têm sido as espécies mais comuns identificadas em infecções orais e gastrointestinais em humanos. (JACOBSON et al., 2014)

As características clínicas de 89 pacientes com bacteremia por *Lactobacillus* foram avaliadas em uma instituição no norte de Taiwan durante 2000-2014. A espécie mais isolada foi *Lactobacillus salivarius*, seguida de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus fermentum*. Os principais focos da bacteremia foram identificados em infecção intra-abdominal e infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter (LEE et al., 2015). A Tabela 2 relaciona as principais espécies de *Lactobacillus* com as respectivas infecções que foram estudadas.

Tabela 2. Tipos de infecções associadas às espécies de *Lactobacillus* adaptado de GOLDSTEIN et al. (2015)

Tipo infecção	Espécies <i>Lactobacillus</i>
Bacteremia	<i>L.jensenii</i> <i>L.rhamnosus</i> <i>L.casei</i> <i>L.salivarius</i> <i>L.gasseri</i>
Colecistite	<i>L.fermentum</i> <i>L.plantarum</i>
Abscesso dental/cárie	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei/paracasei</i> <i>L.gasseri</i> <i>L.plantarum</i>
Empiema	Espécies <i>Lactobacillus</i>
Endocardite	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> <i>L.jensenii</i> <i>L.paracasei</i> <i>L.rhamnosus</i>
Meningite	<i>L.rhamnosus</i>
Peritonite	<i>L.fermentum</i> <i>L.paracasei</i> <i>L.plantarum</i> <i>L.rhamnosus</i>
Infecção prótese joelho	Espécies <i>Lactobacillus</i>
Pielonefrite	<i>L.jensenii</i>

As bacteriocinas, pequenos peptídeos antimicrobianos produzidos por *Lactobacillus*, têm um amplo espectro de ação e são tóxicas principalmente para as bactérias patogênicas Gram-positivas, leveduras e algumas espécies de bactérias Gram-negativas, ao criar poros na sua membrana plasmática ou intervir nas vias enzimáticas de algumas espécies. São bacteriocinas as nisinas, pediocinas, lacticinas, lactococinas, leuconocinas, plantaricinas, enterocinas, carnobacteriocinas, entre outras (GILLOR et al., 2008; BARBOSA et al., 2015).

Diversas espécies de bactérias do ácido láctico já foram testadas quanto ao seu potencial de produção de bacteriocinas, tais como *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus acidilactici* spp., *Carnobacterium piscícola* (DHEWA, 2012). Já foi investigado e comprovado que ocorre um potencial de inibição de *Lactobacillus acidophilus* contra bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens*, *Salmonella* e *E. coli*. diarréiogênicas (HAN et al., 2007).

2.5 Probióticos

Apesar da informação sobre a influência do leite materno na colonização da microbiota intestinal, os conhecimentos sobre a composição de bactérias potencialmente probióticas no leite e nas fezes ainda é limitada. Os probióticos são microrganismos vivos, principalmente pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, apesar de outras espécies também serem comercializadas e apresentarem um efeito benéfico sobre o hospedeiro (OUWEHAND et al., 2016).

As bactérias lácticas (bactérias que produzem ácido láctico como principal produto do metabolismo) são amplamente reconhecidas como benéficas aos seres humanos e animais (NAKAGAWA et al, 2015). Em particular, as espécies de *Lactobacillus* que são encontradas no trato gastrointestinal, têm recebido grande atenção devido às suas propriedades promotoras de saúde (VELJOVIC et al., 2007).

Os principais benefícios à saúde conferidos pelas linhagens microbianas probióticas são: equilíbrio da microbiota intestinal, alívio da constipação, imunomodulação, prevenção do câncer de cólon, melhor digestão da lactose, prevenção de eczemas atópicos, atividade supressiva contra patógenos gastrintestinais (*Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Giardia intestinalis*), prevenção de patologias do trato urogenital feminino, bem como desordens intestinais (diarreia, doença de *Crohn*, síndrome do intestino irritável, retocolite ulcerativa) (ANTUNES et al., 2007).

Em relação ao uso de antimicrobianos, esse é um fator que favorece a proliferação de bactérias oportunistas e/ou invasores, reduz a proporção dos microrganismos endógenos e acumula efeitos prejudiciais ao TGI como proliferação de doenças a curto prazo (DETHLEFSEN; RELMAN, 2011; SOMMER; DANTAS, 2011; IIZUMI et al., 2017). As classes de antimicrobiano apresentam diferentes mecanismos de ação e sistemas de excreção, resultando em diferentes padrões de alteração da composição da microbiota, de forma que essa interferência será dependente da dose e período de exposição (IIZUMI et al., 2017).

O tratamento com antibióticos pode afetar a microbiota intestinal e, paradoxalmente, aumentar a susceptibilidade a infecções. O restabelecimento da colonização mediada por probiótico após o tratamento com antibióticos pode reduzir consideravelmente as infecções, particularmente as causadas por bactérias resistentes a antibióticos (PAMER, 2016).

O uso abusivo de antibiótico tem propiciado a seleção de microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos, reduzindo as opções de tratamento. O uso clínico de antibióticos de largo espectro em habitantes comensais das superfícies mucosas, em especial do trato gastrointestinal, tem sido cada vez mais o foco de investigação laboratorial (DETHLEFSEN et al., 2008; UBEDA et al., 2010; BUFFIE et al., 2012).

A atividade antimicrobiana dos probióticos resulta da produção de ácidos graxos de cadeia curta e outros ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico), que assim reduz o pH e aumenta o efeito bacteriostático dos ácidos orgânicos com relação aos patógenos; da produção de bacteriocinas, que são pequenos peptídeos microbianos com atividade bacteriostática ou bactericida e da produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, altamente reativos e que aumentam o estresse oxidativo dos patógenos em microambientes (VANDENPLASA et al., 2015).

Os microrganismos para preencherem os requisitos que os caracterizem como probióticos devem ser de origem humana; devem ser estáveis frente ao ácido e à bile; devem ser capazes de aderir à mucosa intestinal e de colonizar o trato gastrointestinal humano; devem ter a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas e de serem metabolicamente ativos no nível do intestino. Além disso, devem ter histórico de não patogenicidade e não devem estar associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010; SEMYONOV et al., 2011)

Os probióticos têm demonstrado um potencial significativo como opções terapêuticas para uma variedade de doenças, mas os mecanismos de ação imunológicos e não imunológicos responsáveis por esses efeitos não foram totalmente elucidados. Os mecanismos imunológicos incluem ativação de macrófagos para aumentar a apresentação dos antígenos aos linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A (IgA) tanto local quanto sistêmica. Outro mecanismo relacionado à resposta imune inclui a modulação dos perfis de citocinas (GUARNER et al., 2011; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Por outro lado, os benefícios não imunológicos incluem competição e antagonismo contra a ação dos patógenos: digerir os alimentos; concorrer pelos nutrientes; modificar o pH; produzir bacteriocinas; combater os radicais superóxidos; estimular a produção epitelial de mucina; aumentar a função da barreira intestinal; concorrer por aderência e modificar as toxinas de origem patogênica. A compreensão dos mecanismos de ação permitirá a seleção de cepas probióticas adequadas para aplicações específicas (GUARNER et al., 2011; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a influência do leite materno nos três períodos de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro) sobre a população de *Lactobacillus* nas fezes do recém-nascido, analisando o potencial probiótico dos isolados.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o número de colônias sugestivas do gênero *Lactobacillus* em amostras de coloostro, leite de transição e de leite maduro, bem como em fezes dos respectivos recém-nascidos obtidas no mesmo período de lactação;
- Verificar a presença de *Lactobacillus* em amostras de leite e de fezes com capacidade de adesão à mucina e tolerância à lisozima, pH ácido e sais biliares;
- Analisar se os isolados com potencial probiótico apresentam atividade antagonista contra um enteropatógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Critérios de inclusão para seleção de doadoras de leite e de recém-nascidos

As doadoras foram abordadas no Alojamento Conjunto do Hospital Materno Infantil da UFMA, onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam questionário com identificação da mãe, dados demográficos e sociais, antecedentes obstétricos e aleitamento, assim como dados do recém-nascido e das coletas de leite e de fezes (ANEXO A e ANEXO B).

Foram selecionadas 18 lactantes doadoras voluntárias por conveniência que apresentaram as seguintes características:

- a) Tiveram parto no Hospital Universitário Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão;
- b) Mães com secreção láctea superior às necessidades de seu filho e que se dispuseram a doar o excesso, por livre e espontânea vontade;
- c) Estiveram em perfeitas condições de saúde, não sendo portadoras de doenças crônicas;
- d) Não fizeram uso de antibióticos na semana de coleta ou anterior a cada coleta;
- e) Não apresentaram dificuldades na amamentação;
- f) Aceitaram participar da pesquisa;
- g) Encontraram-se nos períodos de amamentação estipulados para a coleta das amostras.

Foram selecionados 18 recém-nascidos que apresentaram as seguintes características:

- a) Recém-nascidos a termo (≥ 37 e < 42 semanas);
- b) Bebês em aleitamento exclusivo;
- c) Não fizeram uso de antibióticos na semana de coleta ou anterior a cada coleta;
- d) Estiverem em perfeitas condições de saúde, não sendo portadores de doenças crônicas;
- e) Recém-nascidos sem distúrbios gastrointestinais.

4.2 Obtenção de amostras de leite humano

As amostras foram obtidas em cada estágio de lactação (colostró, leite de transição e leite maduro) de mães cadastradas no Banco de Leite do Hospital Materno Infantil do Hospital Universitário da UFMA. A primeira coleta do colostro (até o quarto dia após o parto) foi no Banco de Leite, durante a internação no período puerperal. As mães doadoras foram acompanhadas e orientadas a procederem à higiene das mãos e dos mamilos antes de cada coleta de acordo com o descrito no Manual de Funcionamento dos Bancos de Leite Humano (ANVISA, 2008). Amostras de leite humano (aproximadamente 10 mL) foram obtidas por processo manual, sendo acondicionadas em tubos Falcon de 15 mL estéreis. Os tubos foram etiquetados, mantidos em caixa isotérmica com gelo reciclável e transportados imediatamente (menos de 2h) ao Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA, onde foram submetidas às análises.

As coletas subsequentes foram feitas nos domicílios nas fases da lactação estabelecidas neste estudo, as quais foram obtidas por processo manual (aproximadamente 10 mL), em dois períodos diferentes: entre o sétimo e o décimo quarto dia após o parto (leite de transição) e após a segunda semana (leite maduro), sendo acondicionadas em tubos Falcon de 15 mL esterilizados e etiquetados, mantidos em caixa isotérmica com gelo reciclável e transportadas imediatamente (menos de 2h) ao Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA, onde foram submetidas às análises.

4.3 Coleta de amostras de fezes

As mães foram orientadas a coletarem as fezes com auxílio de espátula estéril, no mesmo dia correspondente à coleta do leite. As amostras foram acondicionadas em coletor estéril e imediatamente transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável até o Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA, onde foram submetidas às análises.

4.4 Isolamento e contagem de colônias

Alíquotas de 0,1 mL de diluições decimais de amostras de leite (até 10^{-5}) e de suspensões de fezes (até 10^{-8}) em PBS foram inoculadas em ágar Man, Rogosa e Sharpe (DifcoTM Lactobacilli MRS Broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) pré-reduzido com 0,25% de cisteína e incubadas em jarra de anaerobiose (Probac, São Paulo, Brasil) a 37°C por 24 a 48 horas, conforme descrito anteriormente (SOTO et al., 2014; KAEWNOPPARAT et al., 2013). As colônias foram contadas a partir das placas com crescimento entre 30-300 colônias. O número de colônias foi estimado em UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro). O limite de detecção da técnica foi estabelecido quando menos de 30 colônias foram detectadas nas placas inoculadas com o leite não diluído. Nesse caso um valor de logaritmo decimal inferior a 2,5 foi utilizado para análise, ou seja, $\log_{10}$ de 300 CFU / mg ou mL).

4.5 Caracterização fenotípica presuntiva das bactérias lácticas

As colônias brancas ou cremosas sugestivas de *Lactobacillus* em ágar MRS com 0,25% de cisteína foram analisadas pela coloração de Gram e pelo teste da catalase (TULUMOGLU et al., 2013). Os bacilos Gram-positivos e que apresentaram teste da catalase negativo foram selecionados para identificação bacteriana em nível de espécie através da amplificação com iniciadores específicos para o gênero *Lactobacillus*, conforme descrito a seguir. Os isolados suspeitos foram armazenados em caldo MRS contendo 20% de glicerol a -80°C.

4.6 Identificação dos isolados por Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Para a confirmação da identidade dos isolados de lactobacilos utilizou-se a técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI-TOF*). Esta análise foi realizada no laboratório Cedro situado em São Luis. Para o teste de identificação os isolados foram cultivados em ágar de *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS, Difco, USA) à 37°C em condições de anaerobiose. Para a análise, amostras individuais de colônias foram raspadas usando uma alça bacteriológica descartável e então aplicadas como uma película fina sobre uma chapa de aço de 24 pontos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após secagem ao ar, a amostra foi co-cristalizada com 1 µl de uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em 50% de acetonitrila / 2,5% de ácido trifluoroacético (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo do refletor em um instrumento de mesa do sistema MicroFlex LT (Bruker Daltonics) usando as configurações padrão do fabricante. Os espectros capturados foram analisados utilizando o controle automatização MALDI Biotyper e o software Bruker Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os critérios de identificação utilizados foram os seguintes: um escore ≥ 2.000 indicou identificação do nível de espécie, um escore de 1.700 a 1.999 indicou identificação no nível do gênero, e um escore < 1.700 foi interpretado como não identificado. Utilizou-se *Escherichia coli* ATCC 8739 como controle positivo.

4.7 Extração do material genético dos isolados para as análises moleculares

Para a extração do DNA genômico, colônias bacterianas isoladas de leite materno foram centrifugadas a 7150 x g por 20 min. Então, o DNA total foi extraído do sedimento usando o *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA foi eluído em um volume de 200 µL de tampão de eluição final e armazenado a -20°C (COLLADO et al., 2009). Foram utilizadas colônias bacterianas isoladas de amostras fecais para a extração do DNA total com o *QIAamp® DNA Stool Mini Kit*, conforme descrito pelo fabricante (Qiagen). O DNA foi eluído em um volume de 200 µL de tampão de eluição final e armazenado a -20°C (TULUMOGLU et al., 2013). Tubos contendo apenas os controles do kit foram incluídos em todas as etapas de lise e de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para servir como controles negativos.

4.8 Identificação do gênero *Lactobacillus* por PCR

A identificação dos isolados em nível de gênero foi feita pela amplificação do DNA bacteriano utilizando-se a técnica de PCR com um par de iniciadores gênero específico para *Lactobacillus*: Lacto-16S-F:5' - GGAATCTTCCACAATGGACG-3' e Lacto-16S-R:5' - CGCTTTACGCCCAATAAATCCGG-3', previamente descritos (ABDULAMIR et al, 2010), que amplifica um fragmento de 200 pares de base do gene 16S rDNA. As reações foram feitas em termociclador Bio-Rad cada tubo de reação consistiu de 12,5 µL do Master Mix PCR-kit (Promega, Madison – WI, EUA), 500 U de Taq DNA polimerase, 400 µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3 mM de MgCl₂, acrescido de 10 pmoles (1 µL) de cada iniciador (senso e antissenso). Como molde foi utilizado, aproximadamente, 100 ng do DNA bacteriano extraído e H₂O estéril (livre de nuclease) para completar o volume final de 25 µL. As condições para o PCR foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos; anelamento a 59°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, houve uma etapa adicional de extensão a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese (90 V por 1 hora) em gel de agarose 2%. Subsequentemente, os géis amplificados tiveram suas bandas visualizadas em um sistema Gel-Doc (Bio-Rad) (SOTO et al., 2014).

4.8.1 Identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas das amostras avaliadas

A identificação em nível das espécies dos isolados de *Lactobacillus* spp. foi realizada por PCR específica. As amplificações foram feitas em termociclador Mycycler Biorad modelo 580BR3578, num volume final de 25 µL contendo, 10 picomoles de cada iniciador universal para a região 16S do DNA ribossomal. FW 27: 5'- AGTTTGATCCTGGCTCAG -3' e 1492 RV: antissenso: 5'- ACCTTGTTACGACTT-3' (EDEN et al., 1991), acrescidos de 12,5 µL de PCR Master Mix - Promega® [Taq DNA polimerase (dNTPs, MgCl₂, tampão de PCR [pH 8,5]), 1,5 µL de água livre de nuclease e 3 µL do lisado bacteriano contendo o DNA molde. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para a determinação do perfil molecular os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.0% em tampão TBE 0,5X a 85 mV durante 1 hora, em

seguida corado com Brometo de etídio (0,5 mg/mL), e visualizados no transiluminador Ultra Violeta, conforme previamente descrito (SAMBROOK et al., 1989). Para a determinação do tamanho do fragmento amplificado utilizou-se durante a eletroforese o marcador de tamanho molecular de 100 pb DNA ladder (Promega®, USA).

4.8.2 Reação de sequenciamento para a confirmação da identidade das espécies de lactobacilos isolados das amostras de leite e fezes.

Com o objetivo de confirmar a identificação obtida pelos métodos fenotípicos, os produtos amplificados na PCR específica com o par de iniciadores universais para bactérias foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) segundo as orientações do fabricante. Para verificar a pureza, a integridade e a concentração do produto purificado foi feito gel de agarose 1,0%, utilizando como padrão de massa e tamanho molecular o *Massruler DNA ladder mix* (Fermentas).

O sequenciamento de cada produto purificado foi feito pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977), em ambas as direções da dupla fita (senso positivo e senso negativo) com o “Kit ABI Prism BigDye” no sequenciador automático ABI 3130 Genétic Analyser (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas pelo menos duas vezes em cada sentido da fita perfazendo um total de quatro sequências da mesma amostra. Todos os sequenciamentos foram feitos pela empresa Myleus Biotecnologia Ltda, sediada em Belo Horizonte-MG.

4.8.2.1 Análise Computacional das sequências

Para verificar a qualidade das sequências os eletroferogramas obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados no programa de dados ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A similaridade entre as sequências foi verificada pelo programa BLASTn do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL et al., 1997), de onde foram selecionadas sequências de referência de outros lactobacilos para análises comparativas pelo programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.9 Caracterização do potencial probiótico dos isolados de *Lactobacillus*

4.9.1 Ensaios de tolerância à lisozima, pH ácido e sais biliares

Após a identificação molecular, os isolados de *Lactobacillus* do leite e das fezes foram submetidos aos ensaios de tolerância às condições do trato gastrointestinal. Inicialmente as bactérias foram ajustadas na densidade óptica de 0,1 no filtro de 600 nm, que corresponde à ordem de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram inoculadas em MRS modificado com lisozima (300 µg/mL), pH (faixas 2 e 4) e sais biliares (0,5% e 1%). Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-8}) após o tempo de exposição de 180 min para verificar a tolerância dos microrganismos às condições avaliadas ao longo do tempo. Como controle, foi utilizado o crescimento de *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 (BOSCH et al., 2012).

4.9.2 Adesão à mucina pelas espécies de *Lactobacillus*

Para a determinação da capacidade de adesão dos lactobacilos foi utilizada mucina gástrica de suíno tipo III (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Inicialmente, a mucina foi solubilizada em PBS (pH 7,4) em uma concentração final de 10 mg/mL. Foram inoculados 500 µL da suspensão em cada orifício de placas de 24 poços, que foram incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, o excesso de solução de mucina foi removida e os poços foram lavados três vezes com 1 mL de PBS (pH 7,4), sendo posteriormente saturados com albumina bovina (fração segundo Cohn) a 2%. Logo, as placas foram incubadas por 4 h a 4°C, e, após o período transcorrido, foram realizadas quatro lavagens com 1 mL de PBS para remoção de resíduos de albumina. Após o preparo das placas, as culturas de *Lactobacillus* spp., foram centrifugadas a 9.000 rpm por 10 min, lavadas três vezes e o sedimento foi ressuspensão em PBS (pH 7,4), devido à elevada produção de ácidos orgânicos. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na densidade óptica de $0,1 \pm 0,01$ a 600 nm, correspondente à ordem de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, e alíquotas de 500 µL foram adicionadas em cada poço, sendo as placas incubadas a 37°C por 1 h. Em seguida, os poços das placas foram lavados três vezes com 1 mL de PBS (pH 7,4) para eliminação das bactérias que não aderiram à proteína. Posteriormente, os poços foram tratados com 1 mL de Triton X-100 a 0,5 durante 10 min, sendo submetidos à raspagem com ponteira. A determinação do número de bactérias aderidas à mucina foi realizada pela quantificação do número de colônias pela semeadura de diluições

seriadas decimais que variaram de 10^{-3} a 10^{-8} em ágar MRS e incubação a 37°C por 24h, em anaerobiose (TALLON et al., 2007).

4.9.3 Ensaio de antagonismo das espécies de *Lactobacillus* contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

O teste de antagonismo foi realizado a fim de verificar se as espécies de *Lactobacillus* produzem substâncias com atividade antimicrobiana contra EPEC, um agente de diarreia infantil (NGUYEN et al., 2005).

Para o ensaio, as culturas de *Lactobacillus* com crescimento de 24h foram centrifugadas a 9.000 rpm por 10 min e os sedimentos bacterianos foram lavados três vezes com PBS. Em seguida, foram ressuspensos no mesmo tampão e ajustados na DO_{600} de $0,1 \pm 0,01$, que corresponde a aproximadamente 10^7 UFC/mL. Alíquotas de 10 μ L da suspensão padronizada de *Lactobacillus* foram inoculadas sobre a superfície do ágar MRS e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h, em anaerobiose. Após incubação, foi adicionada uma sobrecamada com 10 ml de ágar Mueller-Hinton e aguardou-se a solidificação à temperatura ambiente. Em seguida, uma suspensão de EPEC foi padronizada de forma similar à descrita para *Lactobacillus* e semeada sobre a superfície do meio com auxílio de um *swab*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h em atmosfera de aerobiose. Posteriormente, foi feita a leitura a partir da mensuração com régua milimetrada dos halos de inibição produzidos pelos isolados de *Lactobacillus*, de acordo com a metodologia proposta por Carmo et al. (2016).

4.10 Análises estatísticas

As informações do banco de dados foram analisadas no programa R Commander. Testes não paramétricos foram realizados para representar os dados devido à distribuição não normal, dessa forma os resultados foram expressos em termos de medianas com intervalos interquartis. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar mais de dois grupos, como os diferentes períodos (1ª semana, 2ª semana e 3ª semana) em relação a leite e fezes, o número de partos das lactentes (1, 2 e > 2) em relação a contagem de colônias no leite materno e nas fezes infantis, a quantidade de colônias presentes no leite em relação a idade da mãe, assim como os microrganismos que apresentaram perfil probiótico em relação a lisozima, pH 2, pH 4, sais biliares 0,5%, sais biliares 1% e ligação a mucina. Um P-valor de

0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A caracterização da amostra em estudo foi feita através de tabelas de frequência e gráficos. Realizou-se ainda a verificação da existência de correlação entre as três semanas analisadas utilizando o teste de Spearman Rank.

4.11 Questões éticas

O presente trabalho faz parte do projeto guarda-chuva “*Identificação de novos microrganismos com potencial probiótico contra enteropatógenos bacterianos*” que foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA, sob o nº 791.457e na Comissão Científica do Hospital Universitário da UFMA, sob o nº 059/2014 (ANEXO C e ANEXO D).

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas das mães e dos recém-nascidos

Das 18 mães que participaram da pesquisa, 38,8% encontravam-se na faixa etária de 17 a 23 anos. Todas tiveram parto normal, as quais foram selecionadas para o estudo. Com relação ao número de partos, 38,8% das mães relataram o parto do bebê que participou da pesquisa mais um anterior. Cerca de 10 recém-nascidos receberam o primeiro contato com as mães através da amamentação na sala de parto. Nenhuma das mães utilizou qualquer antibiótico uma semana antes do parto ou após o parto. A maioria dos recém-nascidos foi do sexo masculino e todos com idade gestacional a termo. Apenas um bebê usou antibiótico na forma de colírio (Tabela 3).

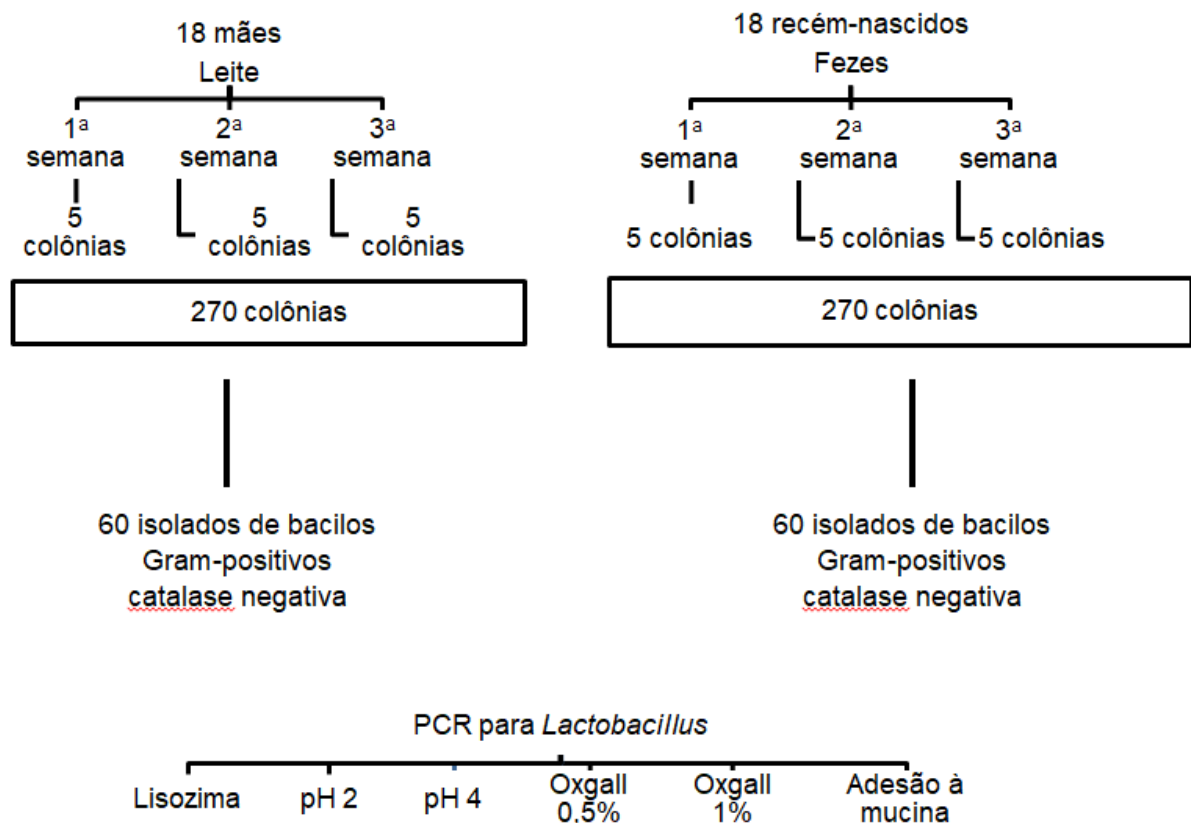
Tabela 3. Características clínicas das mães e seus bebês (n=18 pares mãe-filho)

VARIÁVEIS	
Idade materna (%)	
17 a 23 anos	7 (38,8%)
25 a 30 anos	6 (33,3%)
31 a 36 anos	5 (27,7%)
Paridade (%)	
1	6 (33,3%)
2	7 (38,8%)
>2	5 (27,7%)
Tratamento antibiótico na última semana e/ou após o parto (sim : não)	0 : 18
A criança fez uso de antibiótico após o nascimento (sim : não)	1 : 17
A criança mamou na sala de parto (sim : não)	10 : 8
A mãe faz uso de cigarros (sim : não)	1 : 17
A mãe ingere bebida alcoólica (sim : não)	0 : 18
A mãe é usuária de drogas (sim : não)	0 : 18
Tipo de parto (cesáreo : normal)	0 : 18
Sexo da criança (masculino : feminino)	12 : 6

5.2 Identificação presuntiva dos isolados bacterianos

Os pares constituídos por 18 mães e seus lactentes incluídos no estudo tiveram todas as amostras de leite e fezes analisadas microbiologicamente em três períodos de lactação: fases de colostro, leite de transição e de leite maduro.

Foram selecionadas aleatoriamente 5 colônias de cada fase da amamentação das 18 mães que doaram amostras de leite (colostro, transição e maduro) e de fezes dos 18 lactentes no mesmo período, perfazendo um total de 540 colônias. As colônias que apresentaram características morfotintórias de bacilos Gram-positivos (Figura 1) foram submetidas ao teste da catalase, obtendo-se no final 120 isolados bacterianos de bacilos Gram-positivos e catalase-negativa, segundo fluxograma a seguir.



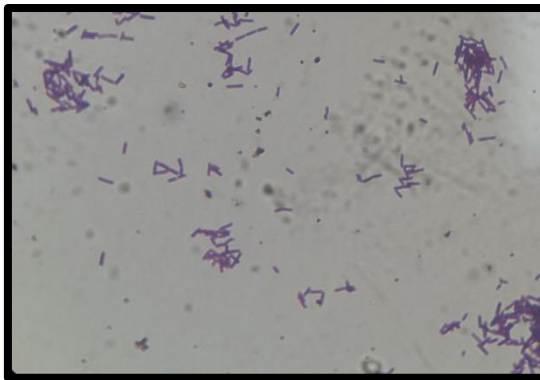


Figura 1. Características morfológicas sugestivas para o gênero *Lactobacillus* spp. isolados de amostras de leite e fezes após coloração pelo método de Gram

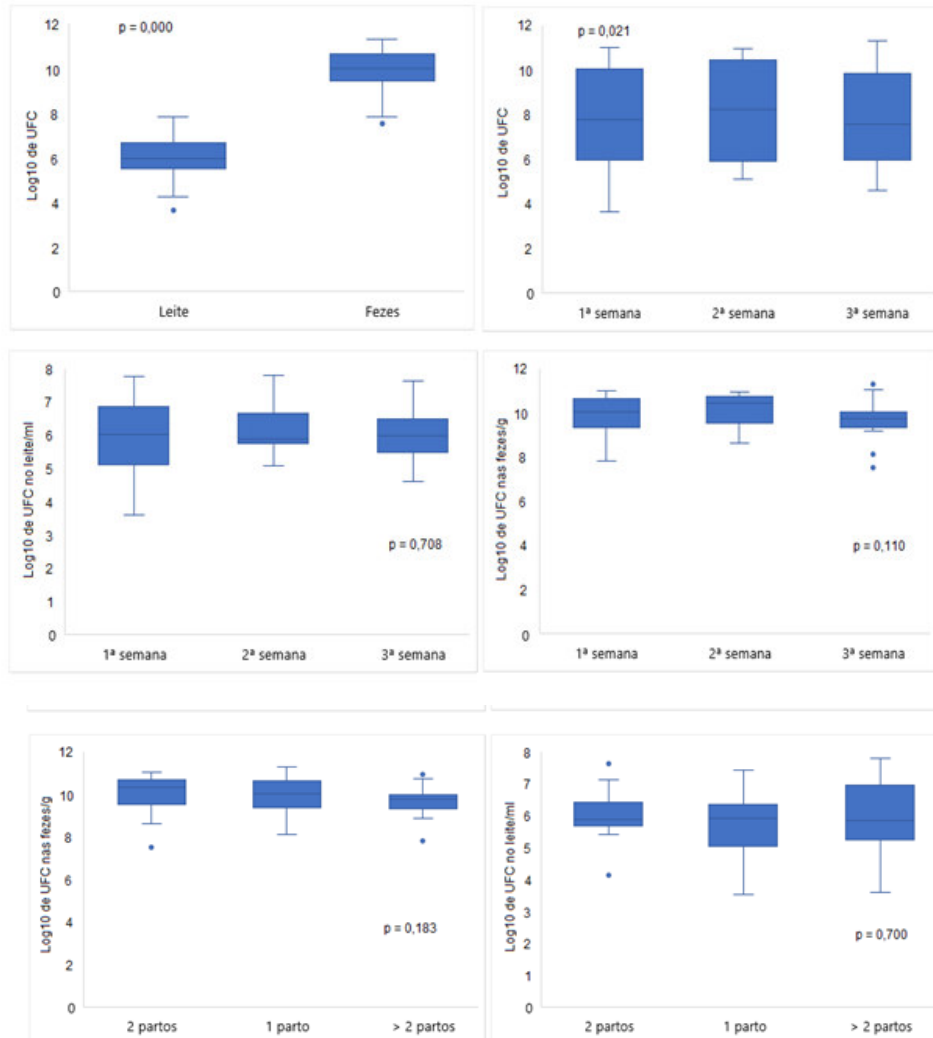
5.3 Determinação do número de bactérias viáveis

A quantificação bacteriana foi realizada pela contagem de colônias em placa de ágar MRS-cisteína que apresentaram entre 30-300 colônias (Figura 2). As contagens mais elevadas foram obtidas em amostras de fezes do que de leite materno (inferiores a 10^8 UFC/mL) em qualquer estágio de lactação e foram superiores a 10^{10} UFC/g em todos os casos, sem haver diferenças quantitativas de *Lactobacillus* na comparação nos três estágios de lactação (Gráfico 1).



Figura 2. Características morfológicas das colônias de *Lactobacillus* após semeadura em ágar MRS para contagem de colônias

Gráfico 1. Quantificação de colônias sugestivas de *Lactobacillus* spp. e relatados como Log10 de UFC / mL em amostras de leite e de fezes



Segundo o Gráfico 1, a contagem total de colônias bacterianas foi significativamente maior nas fezes infantis em relação ao leite materno ($p=0,000$). Porém, na segunda semana a mediana na contagem de colônias das fezes foi maior, 10,39 UFC por grama ($p=0,110$).

5.4 Identificação do gênero *Lactobacillus* por PCR

Dos 120 isolados bacterianos que foram submetidos a ensaios de PCR para a identificação do gênero *Lactobacillus*, através da amplificação do fragmento de 200 pb para o gene 16S do rDNA, 60 isolados oriundos de amostras de fezes e 60 isolados de amostras de leite, apresentaram a amplificação deste fragmento em gel de agarose 2%, segundo a Figura 3.

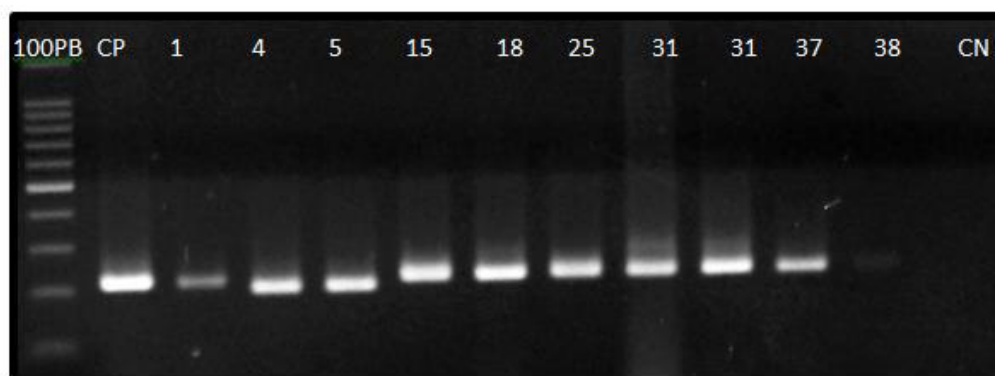


Figura 3. Identificação do gênero *Lactobacillus* por PCR

CP: Controle Positivo (*Lactobacillus fermentum*) CN: Controle Negativo (água e mix)

5.5 Ensaio de tolerância à lisozima, pH ácido, sais biliares e ligação à mucina

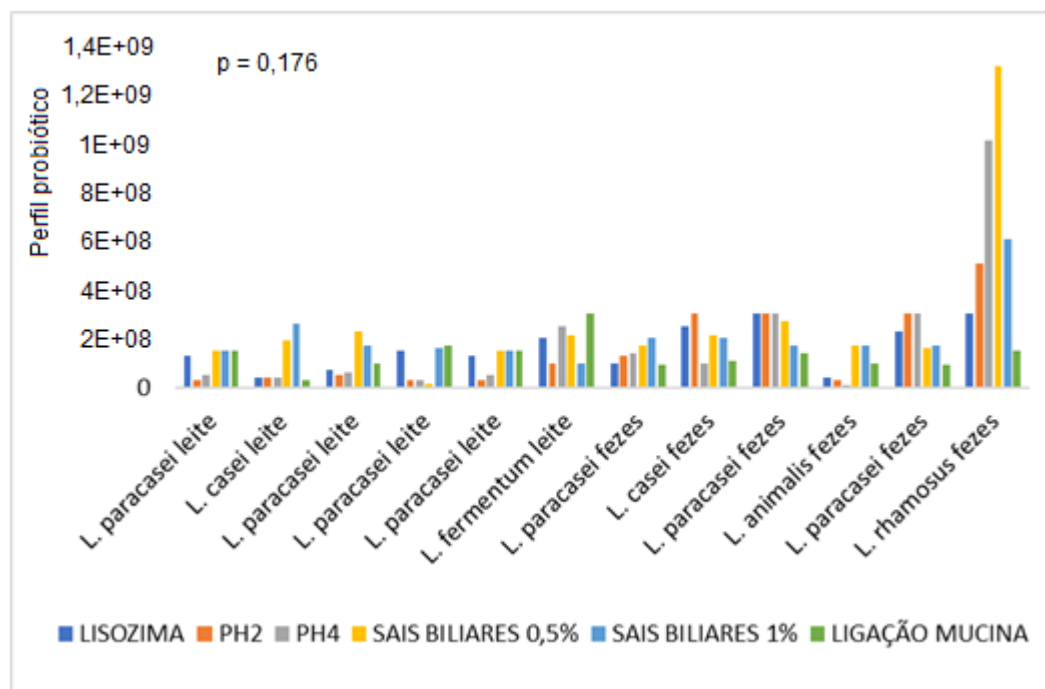
Os ensaios de tolerância ao pH ácido 2 e 4, lisozima 300 µg/mL e sais biliares 0,5% e 1% foram realizados com a finalidade de avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados ao estresse do trato gastrointestinal. A adesão à mucina é considerada um teste importante para um microrganismo com potenciais características probióticas, pois, caso não haja afinidade com os receptores da glicoproteína constituinte do muco intestinal, a bactéria não conseguirá colonizar o trato gastrointestinal e prosseguir na expressão das demais propriedades probióticas.

De acordo com o período de lactação, os isolados bacterianos das fezes apresentaram maior quantificação em média em dois períodos de lactação (segunda semana e terceira semana). Porém, a média de bactérias viáveis (*Lactobacillus* viáveis $\geq 10^7$ UFC) foi superior nas amostras de fezes em todos os estágios de lactação.

De acordo com o período de origem, dos *Lactobacillus* transferidos do leite para as fezes, 12 microrganismos foram selecionados por apresentarem o melhor perfil probiótico. Destes pares, constatou-se que a espécie *Lactobacillus rhamnosus* isolada das fezes (51F) apresentou dois parâmetros (lisozima e sais biliares). Observou-se também que a espécie *Lactobacillus fermentum* isolada do leite (51L) apresentou o melhor perfil de ligação à mucina (Tabela 4).

Segundo a Tabela 4, a quantidade de microrganismos da espécie *Lactobacillus paracasei* foi significativamente maior nas amostras de leite e fezes coletados. O *Lactobacillus casei* também foi encontrado nas duas amostras, porém em menor número

Tabela 4. Espécies de *Lactobacillus* identificadas nas fezes e no leite e submetidas aos ensaios de tolerância às condições do trato gastrointestinal



5.6 Ensaio de antagonismo das espécies de *Lactobacillus* contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Os 60 microrganismos isolados das fezes e 60 microrganismos isolados do leite selecionados através dos ensaios de adesão à mucina e de tolerância ao estresse gastrointestinal foram submetidos ao ensaio de antagonismo com o objetivo de verificar quais produziam substâncias com caráter antimicrobiano contra o enteropatógeno EPEC E-2348/69. Os resultados deste ensaio estão descritos na Tabela 5 na qual é possível observar que os 6 microrganismos isolados das fezes e 2 microrganismos isolados do leite produziram halos de inibição > 10mm. Na Tabela 5 estão listadas as espécies identificadas de *Lactobacillus* transferidas do leite para as fezes produziram halos de inibição contra o enteropatógeno avaliado.

Tabela 5. Espécies de *Lactobacillus* identificadas nas fezes e no leite e submetidas à atividade inibitória de EPEC

Par	Isolado	<i>Lactobacillus</i> x EPEC E-2348/69	Média halo inibição (mm)
Fezes			
1	28F	<i>Lactobacillus paracasei</i>	27
2	33F	<i>Lactobacillus casei</i>	24,33
3	43F	<i>Lactobacillus paracasei</i>	24,33
4	44F	<i>Lactobacillus animalis</i>	13,33
5	49F	<i>Lactobacillus paracasei</i>	33,33
6	51F	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	48,33
Leite			
1	28L	<i>Lactobacillus paracasei</i>	SH
2	33L	<i>Lactobacillus casei</i>	SH
3	43L	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21
4	44L	<i>Lactobacillus paracasei</i>	SH
5	40L	<i>Lactobacillus paracasei</i>	SH
6	51L	<i>Lactobacillus fermentum</i>	26,66

SH = sem halo

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatada a presença de quantidades elevadas de *Lactobacillus* em amostras fecais dos recém-nascidos em relação à quantificação bacteriana nas amostras de leite materno em uma ordem de grandeza superior a 10^{11} UFC/g. Isto sugere que com a transmissão contínua no aleitamento essas bactérias se estabelecem no trato intestinal. Durante os diferentes estágios de lactação, a microbiota do intestino humano infantil sofre alteração, mudando também em resposta a exposições ambientais precoces, tais como tipo de parto, uso de antibióticos, medidas de higiene e dieta (THOMPSON et al., 2015). Contudo, as 18 mães, com seus respectivos bebês, que efetivamente apresentaram isolados bacterianos sugestivos de *Lactobacillus* nos mesmos períodos de lactação tiveram parto normal e seus níveis socioeconômicos e demográficos são condizentes com o cuidado de higiene que apresentaram durante todas as etapas da pesquisa. Além disso, os recém-nascidos apresentaram dieta exclusiva através do aleitamento materno, tendo esse contato acontecido já na sala de parto.

O leite humano proporciona ao lactente um rico complexo microbiano e uma variedade de oligossacarídeos que asseguram a colonização intestinal por microrganismos benéficos para o metabolismo e desenvolvimento imune. O desenvolvimento diferencial do microbioma intestinal em resposta ao leite humano pode estar relacionado a diferenças relatadas na morbidade das doenças infecciosas, na alergia e no risco de obesidade entre lactentes (THOMPSON et al., 2015).

De acordo com Bäckhed et al. (2015) transições significativas ocorrem no intestino do lactente, possivelmente induzidas pelo estabelecimento de um ambiente anaeróbio, disponibilidade de nutrientes e interações microbianas durante a sucessão comunitária. O que pode explicar os dados deste estudo com relação à contagem bacteriana maior no período de lactação intermediário e nas amostras fecais dos bebês no mesmo período.

Os resultados aqui obtidos em bebês a termo mostram que o tipo de parto e os padrões de alimentação têm efeitos importantes na montagem da microbiota intestinal e que a maioria dos colonizadores iniciais são derivados da mãe (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010; BÄCKHED et al., 2015).

Ao analisarmos os *Lactobacillus* das fezes dos recém-nascidos e do leite materno, verificamos a possibilidade de serem potenciais probióticos. Para isso, foram realizados testes para avaliar o perfil de sensibilidade desses isolados ao estresse do trato gastrointestinal.

Os isolados selecionados apresentaram viabilidade na exposição ao trato gástrico e ao trato intestinal, sendo resistentes aos pH ácidos, à ação dos sais biliares e à presença de lisozima. Em sua maioria, esses resultados estão acima de 6 Log UFC/mL, conforme ECKERT, 2016. A contagem de microrganismos para um produto ser considerado probiótico é estabelecido de acordo com a legislação de cada país, entretanto, níveis entre 10^6 e 10^9 UFC/g têm sido sugeridos (FAO/WHO, 2002; ANVISA, 2008), estando os isolados estudados superiores a esses valores. Ainda, quando o probiótico é inserido em um alimento, e este ingerido, o nível de pH do estômago pode aumentar, melhorando a condição da exposição do mesmo e consequentemente sua viabilidade (TULUMOGLU; KAYA; SIMSEK, 2014).

A lisozima compõe os fluidos biológicos, tais como muco e leite materno nas concentrações de 17 a 184 $\mu\text{g/mL}$ (ROČKOVÁ et al., 2013) e atua degradando o peptidoglicano das bactérias Gram-positivas. De um modo geral, os isolados bacterianos aqui estudados, toleraram a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, que está acima dos valores descritos nos fluidos. Isso significa que os isolados conseguem passar da boca e seguir para o estômago.

A influência do pH é importante na viabilidade das células, a resistência dos isolados bacterianos frente a esse parâmetro é dependente tanto da cepa, quanto ao pH selecionado (SAITO et al., 2014). Essa tolerância pode estar relacionada com a diferença da atividade de H^+ -ATPase, proteína que controla a concentração de H^+ intracelular, mantendo assim a homeostase do pH e a viabilidade celular. Além disso, a quantidade e o estado fisiológico do isolado bacteriano podem contribuir para a sua sobrevivência (TUO et al., 2013).

A resistência aos sais biliares é considerada uma característica probiótica importante, já que as enzimas digestivas pepsina e pancreatina são consideradas tóxicas para a maioria dos microrganismos. Porém, essas enzimas digestivas, embora consideradas tóxicas à bactéria, têm pouca influência sobre a tolerância gastrintestinal do probiótico, sendo fatores críticos o baixo pH e a concentração de sais biliares presentes (RANADHEERA et al., 2014). Após a transposição das barreiras gastrointestinais, as próximas barreiras são a adesão ao muco e a competição contra os enteropatógenos.

Assim, a capacidade de aderir à camada de muco no hospedeiro é uma característica probiótica integral, uma vez que é um pré-requisito para a colonização transitória (VALERIANO et al., 2014). Dentre os fatores envolvidos na adesão de *Lactobacillus* spp. à mucina destacam-se os peptídeos muramidase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SÁNCHEZ;URDADI, 2012), a proteína de ligação à fibronectina (FbpB) (HYMES et al., 2016), a proteína RLBRO1264 de *L. brevis* ATCC 367 (DAS et al., 2016) .

Da mesma forma que a ligação à mucina é uma característica fundamental para a formação de uma barreira protetora contra a ação de microrganismos invasores (MESSAOUDI et al., 2012; ZHANG et al., 2013), esse mecanismo é considerado um fator primordial para o patógeno desenvolver uma infecção (KUMAR et al., 2016). Isso acontece quando patógenos secretam mucinases para continuar o processo de colonização do epitélio. Um exemplo é a serina protease Pic de aEPEC que degrada a mucina gástrica de suínos e participa da colonização intestinal em camundongos (ABREU et al., 2016).

Em relação à produção de substâncias antibióticas, as bactérias isoladas no presente estudo apresentaram atividade antagonista para o patógeno bacteriano Gram-negativo testado (EPEC E-2348/69). Esse efeito inibitório observado pode ser devido à produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas ou a combinação de vários desses compostos. (NARDI et al., 2005).

Como cada composto possui sua particularidade no mecanismo de ação, um estudo demonstrou que a produção simultânea de biossurfactantes e bacteriocinas pelo *Lactobacillus casei* MRTL3 inibiu uma gama de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (SHARMA; SINGH SAHARAN, 2014).

No gênero *Lactobacillus*, nossos dados corroboram com pesquisas onde foi relatado que cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* expressaram alta atividade antimicrobiana (KOLL et al., 2008). A estirpe L23 de *Lactobacillus fermentum* e a estirpe L60 de *Lactobacillus rhamnosus* foram sugeridas para a prevenção e tratamento de infecções urogenitais em mulheres, tendo em conta produção de bacteriocinas (RUIZ et al., 2009).

7 CONCLUSÃO

- Os dados nos permitem afirmar que acontece uma transmissão de bactérias do leite materno para o intestino do recém-nascido, ainda sendo o parto normal e o aleitamento materno exclusivo fatores importantes para a transferência de bactérias anaeróbias, em especial as do gênero *Lactobacillus*.
- Os isolados bacterianos das amostras de fezes e de leite apresentaram tolerância ao pH ácido, à ação da lisozima e aos sais biliares. Esses dados sugerem que apresentam um grande potencial como probiótico. O maior número de UFCs encontrados nas fezes sugere que pode acontecer uma transmissão via aleitamento e colonização intestinal por essas bactérias no recém-nascido.
- Um total de 12 espécies bacterianas, incluindo *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*, oriundas do leite materno e encontradas nas fezes dos recém-nascidos mostraram perfis de tolerância, quando submetidos aos testes do pH ácido, ação da lisozima e de sais biliares. Essas espécies foram capazes de se ligar à mucina e também apresentaram atividade antagônica contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Os resultados obtidos mostraram que as espécies bacterianas exibiram potencial probiótico.

Referências

- AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K.M.; GANU, R.; PETROSINO, J.; VERSALOVIC, J. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v.6 p.237-65, 2014.
- ABREU, A.G.; ABE, C.M.; NUNES, K.O.; MORAES, C.T.P.; CHAVEZ-DUENAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A.S.; PIAZZA, R.M.; ELIAS, W.P.. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v.7, n.2, p. 115-125, 2016.
- ABDULAMIR, A.S.; YOKE, T.S.; NORDIN, N.; ABU BAKAR, F. Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.10, p. 1481-1492, 2010.
- ABRAHAMSSON, T.R.; WU, R.Y.; JENMALM, M.C. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. **Pediatric Research**, v.77, n.1-2, p.214-219, 2015.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- ANTUNES, A.E.C.; SILVA, E.R.A.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; LERAYER, A.L.S. Probiotics: health promoting agents. **Nutrire**, São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília, 2008. 160p.
- BÄCKHED, F.; ROSWALL, J.; PENG, Y.; FENG, Q.; JIA, H.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; LI, Y.; XIA, Y.; XIE, H.; ZHONG, H.; KHAN, M.T.; ZHANG, J.; LI, J.; XIAO, L.; AL-AAMA, J.; ZHANG, D.; LEE, Y.S.; KOTOWSKA, D.; COLDING, C.; TREMAROLI, V.; YIN, Y.; BERGMAN, S.; XU, X.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; DAHLGREN, J.; JUN, W. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host and Microbe**, v.17, p. 690–703, 2015.
- BARBOSA, M. DE S.; TODOROV, S.D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLE, T.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B.D. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v.46, p. 254-262, 2015.
- BARBOSA, M.S.; TODOROV, S.D.; IVANOVA, I.V., BELGUESMIA, Y.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLE, T.; FRANCO, B.D.G.M. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. **Food Control**, v.60, p.103-112, 2016.

BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.

BOSCH, M.; M. RODRIGUEZ; F. GARCIA; E. FERNÁNDEZ; M. FUENTES; J. CUÑÉ. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 240-246, 2012.

BUFFIE, C.G.; JARCHUM, I.; EQUINDA, M.; LIPUMA, L.; Gobourne, A.; VIALE, A.; UBEDA, C.; XAVIER, J.; PAMER, E.G. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. **Infection and Immunity**, v.80, n.1, p.62-73, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p.30, 2015.

BRYCE, J.; BLACK, R.E.; WALKER, N.; BHUTTA, Z.A.; LAWN, J.E.; STEKETEE, R.W. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? **Lancet**, v.365, p.2193-200, 2005.

BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic Mechanisms of Action. **Annals Nutrition and Metabolism**, v.61, p.160-174, 2012.

CARMO, M.S. DO; NORONHA, F.M.F.; ARRUDA, M.O.; COSTA, Ê. P. DA S.; BOMFIM, M.R.Q. ; MONTEIRO, A.S.; FERRO, T.A.F.; FERNANDES, E.S.; GIRÓN, J.A.; MONTEIRO-NETO, V. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays in vitro inhibitory activities against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1-11, 2016.

COSTA, E.C da. **Caracterização microbiológica e físico-química do leite humano em diferentes períodos de lactação**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 78p., 2012.

COLLADO, M.; DELGADO, S.; MALDONADO, A.; RODRÍGUEZ, J. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.523–8, 2009.

DAS, J. K.; R. K. MAHAPATRA; S. PATRO; C. GOSWAMI; M. SUAR. *Lactobacillus acidophilus* binds to MUC3 component of cultured intestinal epithelial cells with highest affinity. **FEMS microbiology letters**, v.363, n.8, p. fnw050, 2016.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. **Plos Biology**, v.6, p.e280, 2008.

DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4554-4561, 2011.

DHEWA, T. **Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRITION AND FOOD SCIENCES, 2012.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; COSTELLO, E.K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.11971–11975, 2010.

DONNET-HUGHES A.; PEREZ, P.F.; DORE, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P.; SEGURA-ROGGERO, I.; SCHIFFRIN, E.J. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n.3, p.407-415, 2010.

ECKERT, C. **Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos**. Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Univates. 113p., 2016.

EDEN, P.A.; SCHMIDT, T.M.; BLAKEMORE, R.P.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.324 – 325, 1991.

FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. London, Ontario, Canada, 2002.

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 8, p.44-61, 2007.

FRANCE DE LA COCHETIERE, M.; ROUGE, C.; DARMAUN, D.; CHRISTOPHE ROZE, J.; POTEL, G.; GRAS LEGUEN, C. Intestinal Microbiota in Neonates and Preterm Infants: A Review. **Current Pediatric Reviews**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2007.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GOLDSTEIN, E.J.C.; TYRRELL, K.L.; CITRON, D.M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v.60, n.S2, p.S98–107, 2015.

GONZAGA, D.G. Identificação, caracterização fenotípica e potencial aplicação tecnológica de bactérias lácticas predominantes no leite humano em diferentes fases da lactação. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG, 107p, 2017.

GUARNER, F.; KHAN, A.C.; CARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A.; KRABSHUIS, J.; LEMAIR, T.; KAUFMANN, P.; PAULA, J.A.de; FEDORAK, R.; SHANAHAN, F.; SANDERS, M.E.; SZAJEWSKA, H.; RAMAKRISHNA, B.S.; KARAKAN, T.; KIM, N. Probiotics and prebiotics. **World Gastroenterology Organisation Practice Guideline**, p.14, 2011.

HAN, K.S.; KIM, Y.; KIM, S.H.; OH, S. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, n.5, p.774-783, 2007.

HUNT, K.M.; FOSTER, J.A.; FORNEY, L.J.; SCHÜTTE, U.M.E.; BECK, D.L.; ABDO, Z. FOX, L.K.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.K.; MCGUIRE, M.A. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. **Plos One**, n.6, v.6, p. e21313, 2011.

HYDE, M.J.; MODI, N. The long-term effects of birth by caesarean section: the case for a randomised controlled trial. **Early Human Development**, v.88, p.943–949, 2012.

HYMES, J. P.; B. R. JOHNSON; R. BARRANGOU; T. R. KLAENHAMMER. Functional analysis of an S-Layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2676-2685, 2016.

IIZUMI, T.; BATTAGLIA, T.; RUIZ, V.; PEREZ, G.I.P. Gut Microbiome and Antibiotics. **Archives of Medical Research**, 2017.

JACOBSON, N.; MILSHTeyN, M.; TEITGE, R. Successful Two-Stage Revision of *Lactobacillus* Infection of a Total Knee Arthroplasty and Literature Review. **Surgical Infections**, v.15, n.5, 2014.

JEURINK, P.V.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; JIMÉNEZ; E.; KNIPPELS, L.M.J.; FERNANDEZ, L.; GARSSSEN, J.; KNOLL, J.; RODRIGUEZ, J.M.; MARTÍN, R. Human milk: A source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17–30, 2013.

HYMES, J. P.; B. R. JOHNSON; R. BARRANGOU; T. R. KLAENHAMMER. Functional analysis of an S-Layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2676-2685, 2016.

JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M.L.; MARTÍN, R.; ODRIÓZOLA, J.M.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRIGUEZ, J.M. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, 2008.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.; CHASSARD, C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. **British Journal of Nutrition**, v.110, n.7, p.1253-1262, 2013.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.P.; ROCHAT, F.; CHASSARD, C. Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v.16, p.2891-2904, 2014.

KAewnOPPARAT, S.; DANGMANEE, N.; KAewnOPPARAT, N.; SRICHANA, T.; CHULASIRI, M.; SETTHARAKSA, S. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. **Anaerobe**, v. 22, p. 6-13, 2013.

KHODAYAR-PARDO, P.; MIRA-PASCUAL, L.; COLLADO, M.C.; MARTÍNEZ-COSTA, C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, n. 8, p. 599–605 2014.

KOLL, P.; MANDAR, R.; MARCOTTE, H.; LEIBUR, E.; MIKELSAAR, M.; HAMMARSTROM, L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. **Oral Microbiology and Immunology**, v.23, 139147, 2008.

KUMAR, P.; F. M. KUHLMANN; K. BHULLAR; H. YANG; B. A. VALLANCE; L. XIA; Q. LUO; J. M. FLECKENSTEIN. Dynamic Interactions of a Conserved Enterotoxigenic *Escherichia coli* Adhesin with Intestinal Mucins Govern Epithelium Engagement and Toxin Delivery. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 12, p. 3608-3617, 2016.

LEE, M.-R.; TSAI, C.-J.; LIANGA, S.-K; LINA, C.-K; HUANGE, Y.-T.; HSUEHB, P.-R. Clinical characteristics of bacteraemia caused by *Lactobacillus* spp. and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2000–2014. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.46, p.439–445, 2015.

MATAMOROS, S.; GRAS-LEGUEN, C.; LE VACON, F.; POTEL, G.; DE LA COCHETIERE, M.F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 167–73, abr. 2013.

MESSAOUDI, S.; A. MADI; H. PREVOST; M. FEUILLOLEY; M. MANAI; X. DOUSSET; N. CONNIL. In vitro evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. **Anaerobe**, v. 18, n. 6, p. 584-589, 2012.

MUELLER, N.T., BAKACS, E.; COMBELICK, J.; GRIGORYAN, Z.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. The infant microbiome development: mom matters. **Trends in Molecular Medicine**. v.21, n.2, p.109-117, 2015.

NAKAGAWA, H.; SHIOZAKI, T.; KOBATAKE, E. Effects and mechanisms of longevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v.15, n.2, p.227-36, 2015.

NARDI, M.; SEXTIUS, P.; BONNARME, P.; SPINNLER, H.E.; MONNET, V.; IRLINGER, F. Genetic transformation of *Brevibacterium linens* strains producing high amounts of diverse sulphur compounds. **Journal of Dairy Research**, v.72, n.2, p.179-187, 2005.

NGUYEN, T.V.; LE, V.P.; LE, H.C.; GIA, K.N.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.755-60, 2005.

OHLAND, C.L.; MACNAUGHTON, W.K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 298, n. 6, p. G807-819, 2010.

OUWEHAND, A.C.; FORSSTEN, S.; HIBBERD, A.A.; LYRA, A.; STAHL, B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. **Annals of Medicine**, v.48, n.4, p.246-55, 2016.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D.B.; RELMAN, D.A.; BROWN, P.O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. **Plos Biology**, v. 5, n.7, p.e177, 2007.

PAMER, E.G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, v.352, n.6285, p.535-538, 2016.

PEREZ, P.F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J.; SERRANT, P; SEGURA-ROGGERO, I.; SCHIFFRIN, E.J.; DONNET-HUGHES, A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v.119, p. e724-e732, 2007.

RAMOS, C.V.; ALMEIDA, J.A.G.; SALDIVA, R.D.M.; PEREIRA, L.M.R.; ALBERTO, N.S.M.C. Prevalência do aleitamento materno exclusivo e os fatores a ele associados em crianças nascidas nos Hospitais Amigos da Criança de Teresina – Piauí. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.19, n.2, p.115-124, 2010.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S.K. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p.18–25, 2014.

RAUTAVA, S.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics modulate host–microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neonatology**, 2012; 102:178–84.

ROČKOVÁ, Š.; RADA, V.; HAVLIK, J.; ŠVEJSTIL, R.; VLKOVÁ, E.; BUNEŠOVÁ, V.; JANDA, K.; PROFOUSOVÁ, I. Growth of bifidobacteria in mammalian milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, p. 99-105, 2013.

ROUDIÈRE, L.; JACQUOT, A.; MARCHANDIN, H.; AUJOLAT, F.; DEVINE, R.; ZORGNIOTTI, I.; JEAN-PIERRE, H.; PICAUD, J.C.; JUMAS-BILAK, E. Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 2, p. 156–165, 2009.

RUIZ, F.O.; GERBALDO, G.; ASURMENDI, P.; PASCUAL, L.M.; GIORDANO, W.; BARBERIS, I.L. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. **Current Microbiology**, v.59, p.497-501, 2009.

SAITO, V. S. T.; SANTOS, T. F.; VINDEROLA, C. G.; ROMANO, C.; NICOLI, J. R.; ARAÚJO, L. S.; COSTA, M. M.; ANDRIOLI, J.L.; UETANABARO, A. P.T. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n 2, p.M208-M2013, 2014.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- SÁNCHEZ, B.; URDACI, M.C. Extracellular proteins from *Lactobacillus plantarum* BMC12 prevent adhesion of enteropathogens to mucin. **Current Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 592-596, 2012.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, p.463–5467, 1977.
- SEMYONOV, D.; RAMON, O.; SHIMONI, E. Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p. 1844-1852, 2011.
- SHARMA, D.; SINGH SAHARAN, B. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.
- SOLÍS, G.; REYES-GAVILAN, C.G. DE LOS, FERNÁNDEZ, N.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 307–310, 2010.
- SOMMER, M.O.; G. DANTAS. Antibiotics and the resistant microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 556-563, 2011.
- SOTO, A.; MARTÍN, V.; JIMÉNEZ, E.; MADER, I.; RODRÍGUEZ, J.M.; FERNÁNDEZ, L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.59, n.1, p.78-88, 2014.
- TALLON, R.; ARIAS, S.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. Strain-and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* mediated by proteinaceous bacterial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.442-451, 2007.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S.M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725–2729, 2013.
- THOMPSON, A.L.; MONTEAGUDO-MERA, A.; CADENAS, M.B.; LAMPL, M.L., AZCARATE-PERIL, M.A. Milk - and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.5, p.3, 2015.
- TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, **Journal of Functional Foods**, v.9, p. 225-241, 2014.

TULUMOGLU, S.; YUKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; SIMSEK, O.; CINAR, B.; YAŞAR, E. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. **Anaerobe**, v. 24, p. 36-42, 2013.

TULUMOGLU, S.; KAYA, H.I.; ŞİMŞEK, O. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**. v.30, p.120 – 125, 2014.

TUO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; AI, L.; ZHANG, Y.; HAN, X.; I YI, H. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Anaerobe**. v.21, p. 22 – 27, 2013.

UBEDA, C.; TAUR, Y.; JENQ, R.R.; EQUINDA, M.J.; SON, T.; SAMSTEIN, M.; VIALE, A.; SOCCI, N.D.; VAN DEN BRINK, M.R.M.; KAMBOJ, M.; PAMER, E.G. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.12, p.4332-4341, 2010.

URBANIAK, C.; ANGELINI, M.; GLOOR, G.B.; REID, G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**. v.4, n.1, p.1, 2016.

VALERIANO, V.; PARUNGAO- BALOLONG, M.; KANG, D. *In vitro* evaluation of the mucin- adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. **Journal of Applied Microbiology**, v.117, n.2, p.485-497, 2014.

VANDENPLASA, Y.; HUYSB, G.; DAUBEC, G. Probiotics: an update. **Journal of Pediatrics**, v.91, n.1, p.6-21, 2015.

VELJOVIC, K.; TERZIC- VIDOJEVIC, A.; VUKASINOVIC, M.; STRAHINIC, I.; BEGOVIC, J.; LOZO, J.; OSTOJIC, M.; TOPISIROVIC, L.. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2142–2152, 2007.

VINDEROLA, CG; MOCCHIUTTI, P; REINHEIMER, JA. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal Dairy Science.**, v. 85, n. 4, p. 721-729, 2002.

ZHANG, W.; H. WANG; J. LIU; Y. ZHAO; K. GAO; J. ZHANG. Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. **Anaerobe**, v. 22, p. 97-103, 2013.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada voluntária,

Você está sendo convidada a participar de um estudo intitulado "Identificação de Novos Microrganismos com Potencial Probiótico contra Enteropatógenos Bacterianos" e para isto gostaríamos de contar com a sua ajuda. Esse estudo tem por objetivo investigar bactérias benéficas ao nosso organismo em amostras de leite materno e em fezes de crianças recém-nascidas. A rotina de trabalho consistirá em responder a um questionário contendo informações sobre nome, idade, idade gestacional, data do parto, endereço, telefone de contato; e por três vezes, nos períodos de 5, 15 e 30 dias após o parto, doar aproximadamente 10-20 mL de leite humano e/ou de fezes de seu filho para pesquisa. A coleta foi realizada na residência das mesmas por pessoa previamente treinada. O sucesso deste trabalho dependerá da sua participação, mas esta é voluntária, de forma que poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso informar, da maneira que achar mais conveniente. Informo que as coletas não causarão nenhum mal à você ou ao seu filho.

Por ser voluntária, você não receberá nenhum pagamento para a participação. O trabalho é de interesse científico e está sob responsabilidade do Prof. Dr. Valério Monteiro Neto, professor da Universidade Federal do Maranhão e da Universidade CEUMA. A sua identidade foi mantida em sigilo e a divulgação dos dados visará apenas mostrar resultados obtidos pela pesquisa. Esse estudo é avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNICEUMA. Em caso de qualquer violação das normas éticas a participante poderá recorrer a esse Comitê, através do contato abaixo:

Universidade CEUMA

Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Josué Montello No. 1, Renascença II, São Luís-MA

Telefone: 3214 4212, Email ceuma@ceuma.br

Prof. Valério Monteiro Neto

CRF: 815-MA

São Luís, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa

Assinatura da participante na pesquisa

Assinatura do Responsável

Em caso de dúvidas, esclarecimentos ou reclamações segue o contato do Pesquisador Responsável:

Prof. Valério Monteiro Neto

Universidade CEUMA

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Rua Josué Montello No.1, bairro Renascença II

CEP: 65075-120 São Luís-MA

Telefones para contato: 98 3214 4252 ou 9972 2651 (inclusive a cobrar)

ANEXO B - QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE CEUMA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO ACADÊMICO

Título da pesquisa – IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO CONTRA ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS

1 - IDENTIFICAÇÃO DA MÃE

Data da coleta da amostra (leite e/ou fezes): _____ Número do Questionário: _____	NQUEST	
Nome da mãe: _____		
Data de nascimento: ____/____/____	DATANASC	
Idade da mãe: _____	IDADEMAE	
Endereço: _____ _____ Ponto de Referência: _____		
Tel: _____ e-mail: _____		
Estado civil: (1) Solteira (2) Casada (3) Viúva (4) Separada (5) Divorciada (6) União Consensual	ESTCIVIL	☐

2 - DADOS DEMOGRÁFICOS E SOCIAIS (Critérios de Classificação Econômica Brasil), ABEP, 2008

Até que série o senhora completou na escola: (1) Analfabeta (2) 1º grau incompleto (3) 1º grau completo (4) 2º grau incompleto (5) 2º grau completo (6) Superior incompleto (7) Superior completo	ESCOLAMAE	☐
Quantos banheiros existem na casa? (Considere somente os que têm vaso mais chuveiro ou banheira)_____	QBANHO	☐ ☐
Qual a renda mensal de sua família? incluindo a sua (1) 1 SM (2) > 1 SM até 3 SM (3) > 3 SM até 5 SM (4) > 5 SM até 10 SM (5) > 10 SM	RENDAA	☐
Quantas pessoas vivem desse dinheiro, incluindo a Sra.? ----- -----	QPESVDINH	☐ ☐
Na sua casa a senhora tem: Máquina de lavar roupa sim () não () Vídeocassete ou DVD sim () não () Geladeira? sim () não ()	ELETRODOM	☐

Freezer ou geladeira duplex sim () não ()		
Na sua casa tem-----? Quantos ? Rádio 0 () 1 () 2 () 3 () +4 () Televisão colorida 0 () 1 () 2 () 3 () +4 () Automóvel (somente de uso particular) 0 () 1 () 2 () 3 () +4 ()	ELETROAUTO	☐
Na sua casa trabalha empregado doméstico mensalista? (1) Sim (2) Não	DOMMENSAL	☐
Se sim, quantos empregados? -----	QEMPREGA	☐
Ocupação : Trabalha fora: 1) sim 2) não	OCUPMAE	☐
Tabagismo: (1) Sim (2) Não	TABAGISMO	☐
Drogas:(1) Sim (2) Não	DROGAS	☐
Álcool: (1) Sim (2) Não	ALCOOL	☐

3 - ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS E ALEITAMENTO

Nº de Gestações _____	NGESTACAO	☐ ☐
Nº de Partos _____	NPARTOS	☐ ☐
Nº de Abortos _____	NABORTOS	☐
Data da última menstruação: _____	DUM	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐
Pré-Natal: (1) Sim (2) Não	PNATAL	☐
Nº de consultas:(1) < 6 (2) ≥ 6 (3) Não fez	NCONSULTA	☐
Local do pré-natal: _____ () HUMI () Postos de saúde () Particular () outros	LOCPNATAL	☐ ☐
Em que mês de gestação foi feita a 1ª consulta? _____	MESPCONS	☐

Em que mês de gestação foi feita a 1ª ultra-sonografia? _____	PRIMEIRAUS	☐ ☐
Resultado: _____ semanas _____ dias	RESULTUS	☐ ☐ ☐
Foi orientada sobre aleitamento materno no pré-natal?(1) Sim (2) Não	ORIENAMPN	☐
Tipo de Parto: (1) Normal (2) Cesárea (3) Fórceps (4) Cesárea eletiva (5) Cesárea em trabalho de parto	TIPOPARTO	☐
Intercorrência no Parto: (1) Sim (2) Não	INTEPARTO	☐
Fez uso de antibiótico na última semana de gestação e/ou após o parto: (1) Sim (2) Não	ANTIGPARTO	☐
Fez uso de sulfa na última semana de gestação e/ou após o parto: (1) Sim (2) Não	SULFAGPARTO	☐
Calcular a Idade Gestacional (DUM): _____	IDGESTA	☐ ☐ ☐
A criança mamou em sala de parto: (1) Sim (2) Não	MAMOUSP	☐
Foi orientada sobre aleitamento materno no Alojamento Conjunto? (1) Sim (2) Não	ORIENAMAC	☐
Caso sim, qual a duração do aleitamento materno exclusivo? _____	DURALMEX	☐

4- DADOS DA CRIANÇA

Data de nascimento: ____/____/____	DATANASCR	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐
Sexo:(1) Masculino (2) Feminino	SEXO	☐
Peso ao nascer: _____	PNASCCR	☐ ☐ ☐ ☐
Comprimento nascer: _____	COMPCR	☐ ☐ ☐
Perímetro Cefálico ao nascer: _____	PC	☐ ☐ ☐
Apgar 1º min _____	APGAR1M	☐ ☐
Apgar5º min: _____	APGAR5M	☐ ☐
Idade Gestacional New Ballard	IGNBALLAR	☐ ☐ ☐
Após o parto, a criança apresentou algum problema de saúde? (1) Sim (2) Não	AOSPPROB	☐

Qual problema? _____	QPROBLEMA	☐
Houve necessidade de ficar na UTI? (1) Sim (2) Não	NECUTI	☐
Fez uso de antibiótico após o nascimento: (1) Sim (2) Não	ANTINASC	☐
Desde que nasceu sua criança já recebeu chás, água ou glicose? (1) Sim (2) Não	AGCHAGLIC	☐
Mamadeira de leite? (1) Sim (2) Não	MAMALEITE	☐

5- COLETAS DAS AMOSTRAS DE LEITE E FEZES

PRIMEIRA COLETA DE LEITE:

Mãe e/ou criança fizeram uso de antibiótico e/ou sulfa, anti-inflamatório nesta semana? (1) Sim (2) Não	ANTISUSEM1	☐
Data da primeira coleta de leite: ____/____/____	DATACL1	☐
Idade(dias)	IDADECL1	☐
Volume (ml)	VOLCL1	☐

PRIMEIRA COLETA DE FEZES (mecônio):

Data da primeira coleta de fezes: ____/____/____	DATA CF1	☐
Idade(dias)	IDADEC F1	☐

SEGUNDA COLETA DE LEITE:

Mãe e/ou criança fizeram uso de antibiótico e/ou sulfa, anti-inflamatório na segunda semana após o parto? (1) Sim (2) Não	ANTISUSEM2	☐
Data da primeira coleta de leite: ____/____/____	DATA CL2	☐
Idade(dias)	IDADEC L2	☐

Volume (ml)	VOLCL2	
--------------------	---------------	----------------------

SEGUNDA COLETA DE FEZES:

Data da primeira coleta de fezes: ____/____/____	DATA CF2	
Idade(dias)	IDADEC F2	

TERCEIRA COLETA DE LEITE:

Mãe e/ou criança fizeram uso de antibiótico e/ou sulfa, anti-inflamatório na terceira semana após o parto? (1)Sim (2) Não	ANTISUSEM3	
Data da primeira coleta de leite: ____/____/____	DATA CL3	
Idade(dias)	IDADECL3	
Volume (ml)	VOLCL3	

TERCEIRA COLETA DE FEZES:

Data da primeira coleta de fezes: ____/____/____	DATA CF3	
Idade(dias)	IDADEC F3	

Observação na 1ª coleta: _____ _____
Observação na 2ª coleta: _____ _____
Observação na 3ª coleta: _____ _____

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO UNICEUMA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
CONTRA ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS

Pesquisador: VALÉRIO MONTEIRO NETO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35354614.5.0000.5084

Instituição Proponente: Centro Universitário do Maranhão - UniCEUMA

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 791.457

Data da Relatoria: 30/09/2014

Apresentação do Projeto:

O desenho do estudo visará obter novas espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com potencial probiótico, oriundas de amostras de leite humano e fezes de lactentes e com atividade contra enteropatógenos bacterianos e/ou imunomoduladora. No estudo o delineamento experimento obedecerá o seguinte os seguintes passos: Isolar e identificar bactérias do gênero *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* de amostras de fezes de lactentes e de leite humano em diferentes estágios da lactação (colostró, leite de transição e leite maduro) de mães que tiveram parto prematuro e a termo; Selecionar as espécies com propriedades probióticas in vitro, incluindo: tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares; capacidade antagonista contra patógenos intestinais, capacidade de produção de peróxido de hidrogênio; capacidade de adesão em células eucarióticas intestinais in vitro e à mucina; Investigar a capacidade inibitória sobre a adesão de enteropatógenos bacterianos em células eucarióticas in vitro; Verificar a capacidade de indução de citocinas pró e anti-inflamatórias em células de cultura de tecidos; Avaliar a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio e nitritos por células apresentadoras de antígenos; Investigar o espreado de células apresentadoras de antígenos; Estudar a indução de marcadores de ativação e estado funcional de células dendríticas, macrófagos e linfócitos in vitro e ex vivo; Analisar a expressão de receptores TLR em leucócitos de camundongos

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3214-4265

Fax: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br

ANEXO D – PARECER DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO UFMA

 EBSERH HOSPITAL UNIVERSITÁRIO UFMA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA COMISSÃO CIENTÍFICA – COMIC – HUUFMA	
PARECER CONSUBSTANCIADO		
FINANCIAMENTO ☐ Recurso Próprio ☒ Fomento ☐ Ind. Farmacêutica	NATUREZA DO PROJETO* ☐ Graduação ☐ Especialização ☐ Mestrado ☒ Doutorado ☐ Serviço/HUUFMA ☐ Dep. Acadêmico ☐ Outros	Nº do Protocolo: 2953/2014-10 Data de Entrada no COMIC: 16/07/2014 Nº do Parecer: 059/2014 Parecer: APROVADO

I - IDENTIFICAÇÃO:

Título: Identificação de Novos Microrganismos com Potencial Probiótico contra Enteropatógenos Bacterianos
Pesquisador Responsável: Valério Monteiro Neto
Equipe Executiva: Elizabeth Soares Fernandes, Feliclana Santos Pinheiro, Hermínio Benitez Rabello Mendes, Marcos Augusto G. Grisotto e Maria Rosa Quaresma Bomfim
Unidade do HUUFMA onde será realizado: HUM1
Setor de realização: Banco de Leite
Cooperação estrangeira: Sim () Não (x) Multicêntrico: Sim () Não (x)

II – OBJETIVOS:

- **Geral:** Identificar novas espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com potencial probiótico, oriundas de amostras de leite humano e fezes de lactentes e com atividade contra enteropatógenos bacterianos e/ou imunomoduladora.

- Específicos:

- 1) Isolar e identificar bactérias do gênero *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* de amostras de fezes de lactentes e de leite humano em diferentes estágios da lactação (colostró, leite de transição e leite maduro) de mães que tiveram parto prematuro e a termo;
- 2) Selecionar as espécies com propriedades probióticas *in vitro*, incluindo: tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares; capacidade antagonista contra patógenos intestinais, capacidade de produção de peróxido de hidrogênio; capacidade de adesão em células eucarióticas intestinais *in vitro* e à mucina
- 3) Investigar a capacidade inibitória sobre a adesão de enteropatógenos bacterianos em células eucarióticas *in vitro*;
- 4) Verificar a capacidade de indução de citocinas pró e anti-inflamatórias em células de cultura de tecidos;
- 5) Avaliar a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio e nitritos por células apresentadoras de antígenos;
- 6) Investigar o espalhamento de células apresentadoras de antígenos;
- 7) Estudar a indução de marcadores de ativação e estado funcional de células dendríticas, macrófagos e linfócitos *in vitro* e *ex vivo*;
- 8) Analisar a expressão de receptores TLR em leucócitos de camundongos estimulados com Probióticos

III – CRONOGRAMA: Setembro 2014 à Setembro 2017.

IV - RESUMO DO PROJETO: Trata-se de um estudo experimental visando identificar novas espécies de microorganismos com potencial probiótico, oriundas de amostras de leite humano e fezes de lactentes e com atividade contra enteropatógenos bacterianos e/ou imunomoduladora. Após a seleção das nutrízes, serão realizadas coletas em cada estágio de lactação (coloostro, leite de transição e leite maduro) de mães que tiveram parto a termo (≥ 37 e < 42 semanas) e prematuro com idade gestacional (≥ 34 e < 37 semanas), cadastradas no Banco de Leite do Hospital Materno Infantil do Hospital Universitário da UFMA. Quanto às amostras de fezes, serão obtidas de crianças sem distúrbios gastrointestinais e que não estejam sob uso de antibióticos e serão transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade CEUMA para análise. Outras fases da metodologia deste projeto também contarão com a parceria de outros Centros como: *University of Florida* e Universidade Federal de Minas Gerais. As análises estatísticas serão realizadas através dos seguintes testes: ANOVA, teste t de Student, Tukey e Bonferroni adotando o nível de significância de 0,05 ou 5% ($p < 0,05$). A quantificação expressa em porcentagem será analisada pelo teste do qui-quadrado, adotando o nível de significância de 0,05 ou 5% ($p < 0,05$). Trata-se, portanto, de um projeto de grande relevância e de enorme contribuição, diante da necessidade de novas alternativas ao tratamento de doenças causadas por infecções intestinais e/ou desordens imunológicas, podendo representar um grande avanço para a melhoria da saúde humana. Projeto financiado com recursos do Edital FAPEMA nº 001/2013 Universal, Processo APP-UNIVERSAL-01041/13.

V - PARECER CONSUBSTANCIADO: APROVADO

O parecer **Aprovado** representa a autorização para a coleta de dados no âmbito do HUUFMA, fundamentado na Resolução 001/CAHU/UFMA e 03 de agosto de 2007 da constituição da Comissão Científica - HUUFMA.

VI - OBSERVAÇÃO:

- O início da coleta de dados está condicionado à aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa CEP/HUUFMA;
- A avaliação de projetos posteriores estará condicionada à entrega do relatório final (resumo e resultado, cópia em CD) da pesquisa anterior sob a responsabilidade do investigador principal.

São Luís, São Luís, 15 de Agosto de 2014


 Profa. Dra. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
 Coordenadora /COMIC - HUUFMA

ANEXO E – PROCESSO APP UNIVERSAL FAPEMA

	ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO	Processo APP-UNIVERSAL-01041/13
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE		
NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)		
LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.		
ENDEREÇO: AV. BEIRA MAR, 342		BAIRRO / CEP: CENTRO / 65.010-070
RESPONSÁVEL: Rosane Nassar Meireles Guerra		CARGO: DIRETOR(A)-PRESIDENTE
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO		
NOME: Valério Monteiro Neto		
CPF: 250.376.503-30		IDENTIDADE: 520.329
BANCO: Brasil		Nº AGÊNCIA: 8618-5 Nº CONTA: 111-2
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE CEUMA		
DEPARTAMENTO: Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Ext		
ENDEREÇO: CONJUNTO HABITACIONAL TURU, RUA 11, QD 12, CASA 8		BAIRRO: TURU
CEP: 65.066-750		CIDADE: SÃO LUÍS
ENDEREÇO ELETRÔNICO: vmonteironeto@yahoo.com.br		U.F.: MARANHÃO FONE FIXO: (98)3248-5467
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO		
SOLICITAÇÃO: APP-UNIVERSAL-01041/13		VIGÊNCIA: 15/08/2013 a 15/08/2015
MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL		EDITAL: EDITAL FAPEMA Nº 001/2013 UNIVERSAL
TÍTULO DO PROJETO: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO CONTRA ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS		
ÁREA / SUBÁREA : Ciências Biológicas / Microbiologia		
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO		
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS 15/09/2015	NÚMERO DE PARCELAS 02	VALOR TOTAL 39.500,00

TERMO: 004810/2013

CLÁUSULAS

- Cláusula 01 - O auxílio será concedido conforme condições estabelecidas pela FAPEMA.
- Cláusula 02 - Para efeito deste Termo, a FAPEMA será doravante denominada OUTORGANTE e o beneficiado, OUTORGADO.
- Cláusula 03 - O auxílio, em hipótese alguma, poderá ser destinado para fins diversos dos especificados neste Termo.
- Cláusula 04 - O OUTORGADO declara conhecer integralmente as regras, condições e exigências estabelecidas no Edital nº 001/2013, comprometendo-se ainda a cumprir as exigências descritas no documento citado.
- Cláusula 05 - O OUTORGADO é o único responsável pela elaboração da prestação de contas do auxílio percebido.
- Cláusula 06 - O OUTORGADO obriga-se a apresentar a OUTORGANTE a prestação de contas no prazo de 30 (trinta) dias após o término da concessão do benefício, conforme as normas contidas no Manual de Prestação de Contas da FAPEMA, disponível no portal (www.fapema.br).
- Cláusula 07 - A não apresentação das prestações de contas e demais documentos pertinentes nos prazos estabelecidos ensejará a devolução dos recursos já percebidos, ficando o OUTORGADO impedido de receber novos benefícios de qualquer natureza junto a OUTORGANTE.
- Cláusula 08 - É proibido ao OUTORGADO efetuar quaisquer despesas fora da vigência avençada no presente Termo.
- Cláusula 09 - O OUTORGADO obriga-se a comunicar, por escrito, à OUTORGANTE, qualquer interrupção das atividades concernentes ao projeto, tais como, mudança de endereço, licença para tratamento de saúde, maternidade, paternidade, etc, no prazo de 5 (cinco) dias antecedentes ao afastamento.
- Cláusula 10 - O OUTORGADO cede, desde logo, seus direitos autorais para acesso livre, por meio de repositórios institucionais ou eletronicamente em caso de livros digitais, respeitado o preconizado na Lei nº. 9.610/98 (Lei dos Direitos Autorais).
- Cláusula 11 - O OUTORGADO declara zelar pela adequada proteção dos direitos de propriedade intelectual que possam resultar do projeto apoiado pela OUTORGANTE.
- Cláusula 12 - O OUTORGADO obriga-se a fazer referência ao apoio da OUTORGANTE em todas as formas de divulgação que resultem, total ou parcialmente, de auxílio objeto desse Termo de Outorga, utilizando a logomarca da FAPEMA, de forma adequada e se responsabilizando, ainda, a disponibilizar o mínimo de 20% da tiragem apoiada pela OUTORGANTE para instituições de ensino, pesquisa e/ou bibliotecas públicas.
- Cláusula 13 - O OUTORGADO aceitará qualquer fiscalização que a FAPEMA julgar conveniente proceder.
- Cláusula 14 - A OUTORGANTE poderá, a qualquer tempo e a seu exclusivo critério, cancelar ou suspender o auxílio sem que disso resulte direito algum à reclamação ou à indenização para o OUTORGADO.
- Cláusula 15 - Integra o presente Termo, independentemente de sua transcrição no presente documento, o Edital a que se submete o OUTORGADO e o Manual de Prestação de Contas da FAPEMA.
- Cláusula 16 - O presente Termo não cria e não envolve nenhuma espécie de relação empregatícia entre o OUTORGADO e a OUTORGANTE.
- Cláusula 17 - O OUTORGADO declara que aceita, sem restrições, o auxílio como está deferido e se responsabiliza pelo fiel cumprimento do presente Termo e do Edital citado, em todas as suas especificações, cláusulas e condições, sob pena, de assim não fazê-lo, devolver os recursos oriundos deste benefício à OUTORGANTE.
- Cláusula 18 - Fica eleito o foro de São Luís/MA para dirimir questões oriundas do presente ajuste, com renúncia expressa de qualquer outro, por mais privilegiado que seja.
- Cláusula 19 - O presente Termo entrará em vigor na data de sua assinatura.

LOCAL, DATA E ASSINATURA
São Luís (MA), Data: 15 de Agosto de 2013

OUTORGADO

Rosane Nassar Meireles Guerra
DIRETORA PRESIDENTE FAPEMA
OUTORGANTE

TERMO: 004810/2013