

***Enterococcus faecium* M7AN10 PROBIÓTICO EM MATRIZ ALIMENTAR PARA CÃES**

Fernanda Carvalho Genehr¹
Nathasha Noronha Arechavaleta²
Andréia Monique Lermen²
Priscila Ribeiro Jankoski²
Amanda Souza da Motta³

RESUMO

Probióticos são capazes de melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, trazendo benefícios ao hospedeiro. Atualmente no mercado há poucas opções de alimentos, com probióticos em sua composição, destinados a cães e gatos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma matriz alimentar canina (ração úmida) com o probiótico *Enterococcus faecium* M7AN10. Para tal, avaliou-se a inocuidade, atividade enzimática, atividade antimicrobiana, potencial probiótico e a viabilidade do microrganismo em matriz alimentar canina. O isolado foi considerado inócuo, pois apresentou ausência de atividade hemolítica e de gelatinase, além de ser suscetível a diversos antimicrobianos. *E. faecium* M7AN10 apresentou atividade proteolítica e capacidade de produção de exopolissacarídeo. Em relação a atividade antimicrobiana pelo método da estria radial, o isolado inibiu *Acinetobacter* sp. 1, *Corynebacterium* sp. 4, *Micrococcus luteus* 33, *Micrococcus luteus* 43, *Micrococcus* sp. 3, *Micrococcus* sp. 20, *Micrococcus* sp. 36. Além disso, *E. faecium* M7AN10 apresentou capacidade de autoagregação de 33,50% e resistiu de forma constante quando submetido ao trato gastrointestinal *in vitro* em conjunto com *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 e *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4. O cultivo misto manteve-se viável em matriz alimentar canina durante o período de oito dias. Com base nesses resultados, o isolado *E. faecium* M7AN10 foi considerada uma bactéria candidata a probiótico que pode vir a ser usada como aditivo em alimento para cães.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*, probiótico, cães, matriz alimentar canina, alimento probiótico.

***Enterococcus faecium* M7AN10 PROBIOTIC IN FOOD MATRIX FOR DOGS**

ABSTRACT

Probiotics are capable of improving the balance of the intestinal microbiota, bringing benefits to the host. Currently, on the market, there are few food options with probiotics in their composition intended for dogs and cats. Therefore, this research aimed to develop a canine food matrix (wet food) with the probiotic *Enterococcus faecium* M7AN10. To this end, the harmlessness, enzymatic activity, antimicrobial activity, probiotic potential, and viability of the microorganism in the canine food matrix were evaluated. The isolate was considered harmless, as it showed no hemolytic and gelatinase activity and was susceptible to several antimicrobials. *E. faecium* M7AN10 showed proteolytic activity and exopolysaccharide production capacity.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. fe.genehr@gmail.com

² Discente na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 00192806@ufrgs.br

³ Docente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Correspondência: amanda.motta@ufrgs.br

Regarding antimicrobial activity using the radial stria method, the isolate inhibited *Acinetobacter* sp. 1, *Corynebacterium* sp. 4, *Micrococcus luteus* 33, *Micrococcus luteus* 43, *Micrococcus* sp. 3, *Micrococcus* sp. 20, *Micrococcus* sp. 36. Furthermore, *E. faecium* M7AN10 showed a self-aggregation capacity of 33.50% and resisted consistently when subjected to the gastrointestinal tract in vitro together with *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 and *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4. The mixed culture remained viable in a canine food matrix over eight days. Based on these results, the isolate *E. faecium* M7AN10 was considered a candidate bacterium for a probiotic that could be used as an additive in dog food.

Keywords: *Enterococcus faecium*, probiotic, dogs, canine food matrix, probiotic food.

***Enterococcus faecium* M7AN10 PROBIÓTICO EN MATRIZ ALIMENTARIA PARA PERROS**

RESUMEN

Los probióticos son capaces de mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal, aportando beneficios al huésped. Actualmente en el mercado existen pocas opciones de alimentos con probióticos en su composición, destinados a perros y gatos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una matriz alimentaria canina (comida húmeda) con el probiótico *Enterococcus faecium* M7AN10. Para ello se evaluó la inocuidad, actividad enzimática, actividad antimicrobiana, potencial probiótico y viabilidad del microorganismo en matriz alimentaria canina. El aislado fue considerado inofensivo, ya que no mostró actividad hemolítica ni gelatinasa, además de ser susceptible a varios antimicrobianos. *E. faecium* M7AN10 mostró actividad proteolítica y capacidad de producción de exopolisacáridos. En cuanto a la actividad antimicrobiana mediante el método de las estrías radiales, el aislado inhibió a *Acinetobacter* sp. 1, *Corynebacterium* sp. 4, *Micrococcus luteus* 33, *Micrococcus luteus* 43, *Micrococcus* sp. 3, *Micrococcus* sp. 20, *Micrococcus* sp. 36. Además, *E. faecium* M7AN10 mostró una capacidad de autoagregación del 33,50% y resistió consistentemente cuando se sometió al tracto gastrointestinal in vitro junto con *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 y *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4. El cultivo mixto permaneció viable en una matriz de alimento canino durante un período de ocho días. Con base en estos resultados, el aislado *E. faecium* M7AN10 se consideró una bacteria candidata para un probiótico que podría usarse como aditivo en la comida para perros.

Palabras clave: *Enterococcus faecium*, probiótico, perros, matriz alimentaria canina, alimento probiótico.

INTRODUÇÃO

Muitos cães sofrem de doenças gastrointestinais decorrentes de patógenos ou mesmo alimentação. É comum associar alterações da microbiota intestinal a doenças que afetam diretamente o trato gastrointestinal (TGI), mas a disbiose, definida como uma “alteração na composição da microbiota comensal que é prejudicial ao hospedeiro”, também está associada com doenças, como diabetes *mellitus* tipo 1, doença renal crônica, obesidade e doenças periodontais (1).

Dentro das opções alimentares comercializadas atualmente, há apenas alimentos secos (rações) que contêm probióticos nas suas formulações. O processo de extrusão do *kibble* (grão de ração) e o ambiente ao qual o alimento é exposto promovem uma diminuição na dose final ingerida de microrganismos probióticos, sendo então, uma quantidade insuficiente para realizar

seu efeito benéfico. Schmitz (2) menciona que, das rações contendo probióticos estudadas, todas apresentaram *déficit* de cepas quando comparado aos níveis de garantia e algumas sequer apresentaram crescimento bacteriano relevante.

Entre os microrganismos utilizados como probióticos regulamentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), destacam-se *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, sendo considerados aditivos probióticos que podem ser utilizados na alimentação animal. Ainda com relação a regulamentação, o MAPA estabelece rotulagem e cepas a serem utilizadas como aditivos probióticos, porém não estipula quantidades efetivas a serem ingeridas por animais (3). Por conta disso, são utilizados os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (4), que prevê doses entre 10^8 e 10^9 UFC/g a ser consumido diariamente.

Dentre os microrganismos que podem ser utilizados como probióticos, o *Enterococcus faecium* foi selecionado, pois se destaca pela produção de enterocinas, pela sua presença comensal no intestino de animais e por sua boa resposta quando utilizado para tratar diarreia (5). O isolado *Enterococcus faecium* M7AN10, utilizado nesse estudo, já possui potencial probiótico comprovado *in vitro* nas condições experimentais estudadas (6).

Em formulações comerciais para animais, observa-se a associação de diferentes bactérias probióticas. Por essa razão foram selecionados outros dois isolados, o *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 e o *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4, também bactérias com potencial probiótico comprovados (7), para associar-se com o *E. faecium* M7AN10. Dentro deste cenário, se mostra indispensável a busca por novos alimentos que contenham doses adequadas de bactérias probióticas para serem utilizadas tanto na alimentação diária de cães, quanto como adjuvante em tratamentos clínicos. Este estudo buscou estudar o isolado *E. faecium* M7AN10 como candidato probiótico, explorando sua aplicação em matriz alimentar canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de cultivo

O trabalho foi desenvolvido com três bactérias ácido-láticas isoladas de leite de búfala, *Enterococcus faecium* M7AN10, *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5, previamente identificadas (6,7). Os isolados estocados em caldo MRS com glicerol 20% e armazenados a -20 °C foram reativados em tubos contendo 3 mL de caldo *Mann, Rogosa and Sharpe* (MRS) e incubados à temperatura de 37 °C, por 48 h.

Avaliação da inocuidade de *Enterococcus faecium* M7AN10

Para avaliação da atividade hemolítica, o isolado *E. faecium* M7AN10 foi inoculado em *Columbia Blood Agar*, suplementado com 5% de sangue ovino, incubados a 37 °C por 48 h. As placas de ágar sangue foram examinadas quanto a presença de β -hemólise (zonas claras ao redor das colônias), α -hemólise (zonas em tons de verde ao redor das colônias) ou γ -hemólise (sem zonas ao redor das colônias) (8). Para a hidrólise de gelatina, o isolado *E. faecium* M7AN10 foi inoculado pela técnica de picada em tubos contendo gelatina nutriente (peptona bacteriológica 5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e gelatina 12%). Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 h e colocados sob refrigeração à 4 °C por 30 min. Para a interpretação, foi analisado a consistência do meio (9). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo em ambos os testes.

A susceptibilidade de *E. faecium* M7AN10 aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão, como preconiza o método Kirby-Bauer (10). O microrganismo foi cultivado em ágar MRS e incubado a 37 °C por 24 h, diluído em solução salina 0,85% e a

turbidez ajustada de acordo com a escala 0.5 de McFarland. A seguir, a suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton (MH), com suabe estéril. Os discos de antibiótico utilizados foram: Ampicilina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Eritromicina (15 µg), Estreptomicina (300 µg), Gentamicina (10 µg), Linezolida (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Norfloxacina (10 µg), Tetraciclina (30 µg) e Vancomicina (µg). As placas foram incubadas a 37 °C por 18-24 h, para a avaliação dos halos de inibição de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (11) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (12).

Avaliação da atividade antimicrobiana de *Enterococcus faecium* M7AN10 frente a bactérias patogênicas

Método da gota

Para a determinação da atividade antimicrobiana de *E. faecium* M7AN10 a técnica da gota foi empregada (13). O sobrenadante livre de células (SLC) foi obtido a partir do inóculo de *E. faecium* M7AN10 a 1% cultivado em caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 h. Placas contendo ágar Mueller-Hinton foram previamente semeadas com suabe, utilizando uma suspensão das culturas de bactérias indicadoras, padronizadas de acordo com a Escala de McFarland de 0.5. As placas foram incubadas a temperatura de 37 °C por 24 h e foi avaliada a presença de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em milímetros (mm). As bactérias indicadoras utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como controle, foi utilizada a bactéria indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547.

Método da estria radial

Para avaliação de atividade antimicrobiana de *E. faecium* M7AN10 pelo método da estria radial, a metodologia descrita por Coman et al. (14) foi empregada. Uma alíquota de 50 µL de *E. faecium* M7AN10 foi acrescida ao centro de uma placa contendo ágar Mueller-Hinton e em outra placa contendo ágar nutriente com 5% de lactose, e incubado à 37 °C, por 48 h, em microaerofilia. Posteriormente, suspensões de bactérias indicadoras, padronizadas de acordo com a Escala de McFarland de 0.5, foram inoculadas de forma radial (sentido borda-centro), até o crescimento da cultura de *E. faecium* M7AN10. As placas foram mantidas à 37 °C por 24 h, em aerobiose e foi avaliada a inibição do crescimento das bactérias indicadoras. Este experimento foi realizado em triplicata. Os isolados utilizados são provenientes do Hospital Veterinário da UFRGS: *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium* sp., *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus* sp., *Pantoea ananatis*, *Bacillus* sp., *Leclercia adecarboxylata* e a levedura *Candida guilhermondii*. Como controle, foi utilizada a bactéria indicadora *C. fimi* NCTC 7547.

Avaliação da atividade enzimática

A determinação da atividade proteolítica foi avaliada de forma qualitativa em ágar leite (ágar tripton de soja – TSA + 10 % de leite desnatado bovino). O isolado *E. faecium* M7AN10 foi inoculado pela técnica de picada em ágar leite, em triplicata, e a placa foi incubada a 37 °C durante 48 h. Os resultados foram determinados com base na formação de uma zona clara (halo de proteólise) ao redor da colônia e o diâmetro desta zona clara foi medido para avaliação da atividade proteolítica (15). *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

Avaliação do potencial probiótico *in vitro* das bactérias ácido-lácticas selecionadas

Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeo

A capacidade de produção de exopolissacarídeo (EPS) do *E. faecium* M7AN10 foi avaliada, conforme metodologia descrita por Freeman et al. (16). O isolado *E. faecium* M7AN10 foi semeado pela técnica de esgotamento em placa contendo o meio Vermelho Congo e incubado à 37 °C por 48 h. Os resultados positivos foram determinados com base na formação de colônias pretas, enquanto os não produtores de exopolissacarídeo apresentaram crescimento de colônias com coloração rosa. *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo e o isolado *Bacillus altitudinis* 1.4 foi utilizada como controle negativo.

Avaliação da capacidade de autoagregação

A capacidade de autoagregação de *E. faecium* M7AN10 foi analisada através da metodologia descrita por Del Re et al. (17) com modificações. Inicialmente, o isolado foi cultivado em caldo MRS a 37 °C por 24 h e centrifugado a 7.000 x g por 15 minutos, para obtenção do precipitado de células. Foram realizadas duas lavagens com PBS 1x (pH 7,0), para retirar resíduos de meio de cultivo. Os precipitados foram então ressuspensos em 5 mL de PBS 1x homogeneizados em vórtex e incubados a temperatura ambiente por 5 h. A capacidade de autoagregação do isolado foi avaliada individualmente durante o período de incubação da suspensão celular. Foram retiradas alíquotas de 100 µL nos tempos: inicial (t₀), 1 hora (t₁), 2 horas (t₂), 3 horas (t₃), 4 horas (t₄) e 5 horas (t₅). Cada alíquota foi transferida para um tubo contendo 3,9 mL de PBS 1 X e analisada em espectrofotômetro Hitachi U-1100, para determinação da densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀). A capacidade de autoagregação foi determinada pelo cálculo a seguir, onde A_t representa a absorbância em t₁, t₂, t₃, t₄ e t₅, e A₀ representa o tempo inicial.

$$\text{Auto-agregação (\%)} = 1 - \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

Preparo do cultivo misto de bactérias

Os isolados *E. faecium* M7AN10, *L. paracasei* LB 6.4 e *L. rhamnosus* LB 1.5 foram cultivados em ágar MRS a 37 °C por 48 h e transferidos individualmente para tubos contendo 5 mL de caldo MRS, sendo incubados a 37 °C por 24 h. Após esse período, alíquotas de 100 µL de cada isolado foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de caldo MRS, sendo incubados a 37 °C por 24 h. Este cultivo misto foi utilizado para avaliar a tolerância ao trato gastrointestinal e sua viabilidade ao ser inoculado em matriz de alimento úmido canino, previamente esterilizado.

Tolerância do cultivo misto de probióticos ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo

Para este estudo, foi utilizado um cultivo misto de bactérias, conforme descrito no item 2.5.3. Para avaliar a tolerância as condições do trato gastrointestinal (TGI) realizou-se contagem celular por microdiluição em três condições: antes da exposição ao TGI, após exposição ao suco gástrico simulado (SGS) e após exposição ao suco intestinal simulado (SIS) (18).

Os isolados foram cultivados juntos em caldo MRS a 37 °C por 24 h e uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular antes da exposição à simulação do TGI. O cultivo misto foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min para obtenção do precipitado de células, e foram realizadas duas lavagens com PBS 1x (pH 7,0) para retirada de resíduos do meio de cultura.

Para avaliar a tolerância dos isolados às condições do estômago, foi preparada a solução de suco gástrico simulado (SGS) (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃, pH 2,0, suplementado com 3 g/L de pepsina), com a qual os precipitados foram ressuspensos. Os cultivos em SGS foram então incubados a 37 °C por 90 minutos, mimetizando as condições gástricas. Após, uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular após exposição à simulação do estômago. Em seguida, os isolados foram centrifugados a 7.000 x g por 10 minutos para obtenção do precipitado de células, e novamente foram realizadas duas lavagens com PBS 1x. Para avaliar a tolerância às condições do intestino, foi preparada a solução de suco intestinal simulado (SIS) (22 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 7,6 mM NaHCO₃, pH 8,0, suplementado com 0,1% pancreatina e 0,15% sais biliares), com a qual os precipitados foram ressuspensos. Os cultivos em SIS foram incubados a 37 °C por 150 minutos, mimetizando as condições do TGI. Por fim, uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular após exposição à simulação do intestino. Este experimento foi realizado em triplicata.

Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar

A avaliação da sobrevivência do isolado *E. faecium* M7AN10 e do cultivo misto das bactérias lácticas (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4) foi avaliado em matriz alimentar. Os microrganismos foram inoculados (10⁸ UFC/mL) em uma matriz alimentar para cães (ração úmida comercial) com 8% de umidade, previamente esterilizada. O grupo controle do alimento foi realizado utilizando salina 0,85% previamente esterilizada. Alíquotas de 100 µL foram coletadas no tempo 0 (t₀), tempo 1 (4^o dia, t₁) e tempo 2 (8^o dia, t₂). Para cada alíquota, foram realizadas microdiluições seriadas até 10⁻⁶ e inoculadas em *Plate Count Agar* (PCA), à 37 °C por 48 h (19). Os resultados foram expressos em UFC/g de matriz alimentar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da inocuidade de *Enterococcus faecium* M7AN10

A bactéria candidata a probiótico *E. faecium* M7AN10 apresentou γ -hemólise, ou seja, ausência de atividade hemolítica. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos por Dinçer e Kivanç (20), onde foi avaliada a segurança de isolados de *E. faecium* a partir da atividade hemolítica e nenhum isolado demonstrou essa atividade. Resultados similares foram encontrados por Fugaban et al. (21) ao avaliar a atividade hemolítica de *E. faecium*, isolados de uma pasta de soja fermentada tradicional coreana. A atividade hemolítica é um dos fatores de virulência conhecido entre microrganismos patogênicos (21). A ausência desta propriedade é um dos critérios de segurança analisado em cepas estudadas como candidatas a probiótico.

A bactéria *E. faecium* M7AN10 apresentou resultados negativos para a degradação da gelatina. Esse resultado corrobora com outros estudos com *E. faecium* encontrados na literatura (21-23). A produção de gelatinase também é conhecida como fator de virulência necessário para a invasão de patógenos bacterianos, promovendo infecção sistêmica (24). Além disso, a gelatinase pode hidrolisar gelatina, caseína, hemoglobina, insulina, colágeno e fibrinogênio, logo a presença desta atividade em isolados com potencial probiótico é uma característica indesejável (21).

O isolado *E. faecium* M7AN10 mostrou-se suscetível a todos os antimicrobianos testados, exceto a ciprofloxacina, classificando-se como intermediário. A resistência a ciprofloxacina também foi descrita por Kim et al. (25). Em outro estudo, Amachawadi et al. (26) avaliaram a suscetibilidade de *E. faecium* a antimicrobianos e verificaram suscetibilidade à gentamicina, linezolida, nitrofurantoína, estreptomicina e vancomicina, indo ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho. Já no estudo desenvolvido por Slyvka et al. (27), os enterococos analisados também apresentaram alta sensibilidade à eritromicina, tetraciclina e vancomicina, contudo os autores verificaram resistência a gentamicina e estreptomicina. A resistência aos antimicrobianos é comum entre as bactérias do gênero *Enterococcus*, por sua capacidade de adquirir resistência e transferir genes de resistência horizontalmente (26). Neste cenário, ser suscetível à diferentes antimicrobianos é uma característica desejável quando se pesquisa o potencial probiótico de uma bactéria. Ao ingerir uma bactéria probiótica, ela passa a participar da microbiota intestinal, e por essa razão a resistência aos antimicrobianos deve ser avaliada, pois representa uma ameaça à saúde animal (28).

Slyvka et al. (27) destacaram que isolados de *E. faecium* e *Enterococcus durans* representam um risco menor para utilização em alimentos, tendo em vista que possuem menos determinantes de virulência reconhecidos do que *Enterococcus faecalis*. Geralmente, a incidência de tais determinantes de virulência entre isolados de *E. faecium* é baixa, em comparação com isolados de *E. faecalis*, provavelmente devido à presença de plasmídeos responsivos a feromônios. Portanto, destaca-se que os resultados do presente estudo demonstram a segurança do *E. faecium* M7AN10, o que sugere que este isolado pode ser utilizado em produtos alimentares.

Avaliação da atividade antimicrobiana de *E. faecium* M7AN10 frente a bactérias patogênicas

Na avaliação da atividade antimicrobiana da *E. faecium* M7AN10 pelo método da gota, não foram observados halos de inibição frente as bactérias indicadoras testadas (*E. coli* ATCC 10536, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. aureus* ATCC 25923). Já para o controle utilizado, *C. fimi* NCTC 7547, foram observados halos de inibição medindo, aproximadamente, 5 mm (Tabela 1). Esse resultado difere do encontrado por Huang et al. (29), onde foi observado atividade antimicrobiana de *E. faecium* B1 contra *L. monocytogenes* ATCC 19115. Já em outro estudo desenvolvido por Sharma et al. (30), a enterocina purificada a partir do sobrenadante da cultura de *E. faecium* 12a inibiu *Salmonella enterica* MTCC 733, *Shigella flexneri* MTCC 1457, *Vibrio cholerae* MTCC3906, *Escherichia coli* MTCC 119 e *Listeria monocytogenes* MTCC 657. No trabalho de Rahmani et al. (31), através do método de difusão de poço, os autores observaram efeitos inibitórios (zona de inibição ≥ 23 mm) do SLC, principalmente em *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*.

Já na avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da estria radial, *E. faecium* M7AN10 demonstrou capacidade antimicrobiana, apresentando atividade bio-protetora frente a *Acinetobacter* sp. 1, *Corynebacterium* sp. 4, *Micrococcus luteus* 33, *Micrococcus luteus* 43, *Micrococcus* sp. 3, *Micrococcus* sp. 20, *Micrococcus* sp. 36 (Tabela 1). Através do mesmo método, Coman et al. (14) verificaram que *L. rhamnosus* IMC 501 era capaz de inibir *L. monocytogenes* 306, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* DSM 1103, *E. coli* EPEC IMV1 e *S. Enteritidis* DSM 14221.

Destaca-se que a atividade antimicrobiana das BAL se deve à produção de ácidos orgânicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, diacetil, ácidos graxos e bacteriocinas (27). Além disso, a capacidade de inibir bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos é uma das propriedades de interesse ao se investigar uma cultura probiótica (31).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de *Enterococcus faecium* M7AN10, pelo método da estria radial, frente à isolados do Hospital Veterinário da UFRGS.

Isolado	Halo de inibição (mm)	
	ágar Mueller-Hinton	ágar nutriente com 5% lactose
<i>Acinetobacter</i> sp. 1	0	8,3
<i>Bacillus</i> sp. 38	0	0
<i>Candida guilhermondii</i> 46	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 4	0	4,7
<i>Corynebacterium</i> sp. 14	17,5	8,7
<i>Leclercia adecarboxylata</i> 50	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> 33	11,5	16,5
<i>Micrococcus luteus</i> 43	22	12
<i>Micrococcus</i> sp. 3	17,3	16,7
<i>Micrococcus</i> sp. 20	16,7	0
<i>Micrococcus</i> sp. 36	16,5	0
<i>Pantoea ananatis</i> 29	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> 13	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 18	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 6	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 55	0	0
<i>Staphylococcus</i> sp.35	0	0
<i>Staphylococcus</i> sp.39	0	0
<i>Staphylococcus</i> sp. 42	0	0
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	0	0

Avaliação da atividade enzimática

No presente estudo, foi realizado o teste da atividade proteolítica de forma qualitativa com ágar leite. Foram observados halos ao redor do isolado *E. faecium* M7AN10, indicando hidrólise da caseína, ou seja, o isolado apresentou atividade proteolítica. Resultados semelhantes foram encontrados por Kordesedehi et al. (32) ao avaliarem de forma qualitativa a atividade proteolítica de *E. faecium* em ágar leite-citrato. Nos estudos desenvolvidos por Sousa et al. (33), *Enterococcus* sp. BW32, isolado de soro de leite de búfala e, *Enterococcus* sp. GW33, isolado de soro de leite de cabra, apresentaram atividade proteolítica em ágar leite. Já Dinçer e Kivanç (20) avaliaram a atividade proteolítica de maneira quantitativa com tirosina e verificaram que *E. faecium* 29-P2, *E. faecium* 168-P6 e *E. faecium* 277-S3 demonstraram 0,340 mg tirosina/mL, 0,041 mg tirosina/mL e 0,007 mg tirosina/mL, respectivamente.

Papadimitriou et al. (34) sugeriram, em seu trabalho, que a atividade proteolítica de bactérias do gênero *Enterococcus* se sobressai com relação às outras BALs. Na produção de alimentos, os autores citam a importância dessa atividade na produção de peptídeos bioativos e na redução da alergenicidade das proteínas derivadas do leite. Segundo Kordesedehi et al. (32), a proteólise do leite pode reduzir a quantidade de epítomos antigênicos e, por consequência, diminuir a alergenicidade do leite. Além disso, os produtos metabólitos produzidos por BAL,

como proteases, podem ser utilizados para o desenvolvimento de sabor e aroma de alimentos (20).

Avaliação do potencial probiótico *in vitro* das bactérias ácido-lácticas selecionadas

Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeos

Após 48 horas de incubação, observou-se a formação de colônias pretas, confirmando que *E. faecium* M7AN10 é produtor de EPS. O controle positivo utilizado, *S. aureus* ATCC 25923, também apresentou colônias pretas, enquanto *B. altitudinis* 1.4, utilizado como controle negativo, apresentou colônias róseas, comprovando a eficácia do meio. Resultados similares foram encontrados por Ghattargi et al. (23) ao observarem que *E. faecium* 17OM39 foi produtor de EPS. No entanto, resultados contrários foram obtidos por Dinçer e Kivanç (20) ao verificarem que *E. faecium* 29-P2, *E. faecium* 168-P6 e *E. faecium* 277-S3 não foram produtores de EPS, ressaltando a variabilidade entre os diferentes isolados de *E. faecium*.

Destaca-se que os EPS produzidos por bactérias probióticas são de grande importância porque são geralmente considerados seguros (GRAS) e utilizados para atividades biológicas *in vitro*, bem como em condições *in vivo*. Os EPS são explorados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. São amplamente estudados em aplicações farmacológicas como anticoagulantes, antialérgicos, antitrombóticos e imunomoduladores (35). Além disso, Song et al. (36) ressaltam a aplicação de EPS como aditivos naturais em alimentos, usados como emulsificantes e estabilizantes. Os autores também enfatizam que as propriedades físicas dos EPS aumentam a colonização de bactérias probióticas no TGI, promovendo suas características funcionais.

Avaliação da capacidade de autoagregação

A média da autoagregação do *E. faecium* M7AN10 obtida foi de 33,50%, sendo t_5 o intervalo com maior capacidade de autoagregação (50,95%). De acordo com Brandalize (5), a autoagregação está relacionada com a capacidade de adesão no epitélio intestinal, sendo assim um dos critérios utilizados para selecionar bactérias candidatas a probiótico. Essa característica está associada a várias funcionalidades das células bacterianas, como a capacidade de se adaptar a ambientes estressantes e evitar respostas imunes do hospedeiro (21).

O resultado do presente estudo foi superior ao encontrado por Espeche *et al.* (37), onde o isolado *Enterococcus faecium* CRL1839 apresentou uma autoagregação de 10,96%. Entretanto, Fugaban et al. (21) encontraram altos níveis de autoagregação (>50%) para *Enterococcus faecium* ST651ea, *Enterococcus faecium* ST7119ea e *Enterococcus faecium* ST7319ea. Já nos estudos de Brandalize (5), dos 54 isolados analisados, 32 apresentaram capacidade de autoagregação, representando 60% dos *E. faecium* analisados. Em outro trabalho, Zommiti *et al.* (38) estudaram *E. faecium* isolado de carne seca artesanal da Tunísia “Dried Ossban”. Os autores verificaram que *E. faecium* MZF4 apresentou o nível mais baixo de autoagregação (50%), enquanto *E. faecium* MZF2 e *E. faecium* MZF1 apresentaram os níveis mais elevados com 94% e 96%, respectivamente. Destaca-se que a autoagregação provou ser específica da cepa e pode variar dentro do mesmo grupo taxonômico (39).

A autoagregação é considerada uma vantagem para microrganismos probióticos considerando que prediz possíveis propriedades de adesão *in vitro* ao epitélio intestinal, auxiliando na colonização do microrganismo probiótico e prevenindo a colonização de bactérias patogênicas (21,38). Apesar da literatura indicar isolados com melhores níveis de autoagregação, não se exclui o potencial do *E. faecium* M7AN10 como probiótico, visto que os resultados encontrados confirmam a capacidade deste isolado de adesão ao epitélio intestinal.

Tolerância do cultivo misto de probióticos ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo

A tolerância ao trato gastrointestinal do isolado *E. faecium* M7AN10 já foi estudada por Kurtz et al. (6), contudo neste trabalho foi utilizado um protocolo simulando o TGI em forma de fluxo contínuo. Para este experimento um cultivo misto de 3 isolados de bactérias lácticas (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4) foi exposto ao SGS e SIS, por períodos correspondentes ao da digestão.

Sendo assim, a viabilidade ao trato gastrointestinal foi determinada *in vitro*, sendo que todos os pontos coletados (após as lavagens com PBS 1X, após expor ao SGS e após expor ao SIS) partiram de $9,60 \pm 0,65$ log UFC/mL (aproximadamente 10^9 UFC/mL). O cultivo misto de bactérias contendo *E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4 se manteve em concentração constante (Figura 1). Os valores médios após o SGS se mantiveram em aproximadamente $9,55 \pm 0,53$ log UFC/mL e após o SIS em aproximadamente $9,50 \pm 0,84$ log UFC/mL.

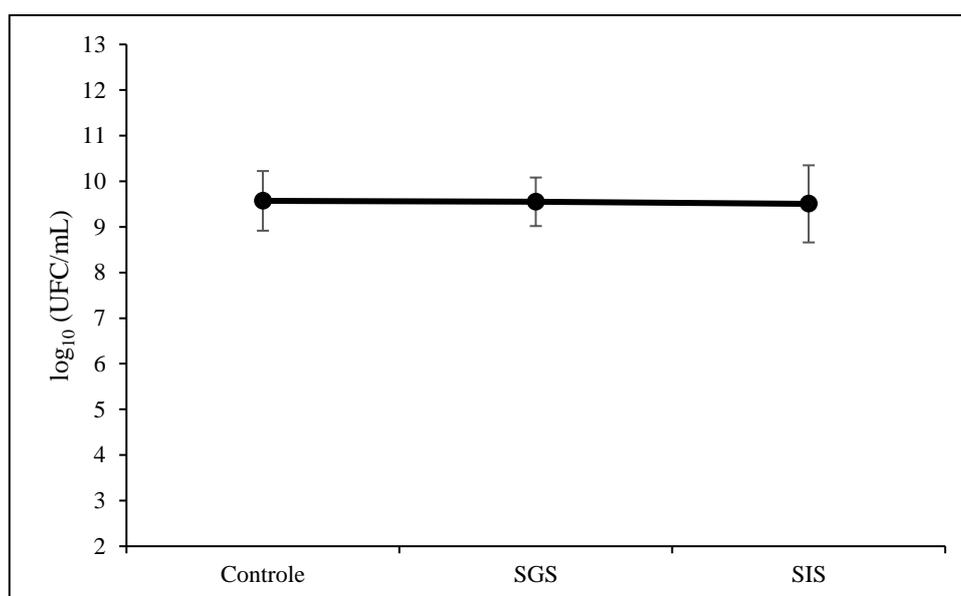


Figura 1. Concentração do cultivo misto de bactérias contendo *E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4, após a exposição ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo.

O cultivo misto deste estudo apresentou-se com concentração constante, diferente do encontrado por Amaral et al. (40), onde o isolado estudado se manteve constante apenas após a exposição às condições gástricas. Já Succi et al. (41) identificaram um decréscimo na contagem de *L. rhamnosus* ao expô-lo a um ambiente ácido, enquanto neste trabalho as contagens se mantiveram praticamente constantes. Diversas cepas de *L. paracasei* sofreram reduções quando expostas ao pH ácido, à pepsina, à pancreatina e aos sais biliares (42).

Nos estudos de Zommiti et al. (38), todos *E. faecium* exibiram alta tolerância à acidez após exposição ao meio pH 3, e também foram tolerantes aos sais biliares, uma vez que todos sobreviveram com sucesso em meio caldo MRS suplementado com 30 g/L de sal biliar, refletindo a concentração fisiológica da bile humana. Já nos estudos desenvolvidos por Santos et al. (39), *E. faecium* EM485 e *E. faecium* EM925 foram expostos a condições simuladas do estômago e do intestino delgado. Foi observado uma redução na contagem de células de 3,98 log UFC/mL para *E. faecium* EM485 após exposição a condições simuladas de estômago e

intestino delgado. Resultados semelhantes foram registrados para *E. faecium* EM925, com redução no número de células de 3,03 log UFC/mL.

Os probióticos devem sobreviver no ambiente gástrico ácido para alcançar o intestino delgado e colonizar o hospedeiro, transmitindo assim os seus benefícios. As espécies de *Enterococcus* são consideradas intrinsecamente resistentes ao ácido. Embora existam diferenças entre espécies e cepas, os organismos geralmente apresentam maior sensibilidade em valores de pH abaixo de 3,0 (39). Portanto, a tolerância aos ácidos é uma das propriedades desejáveis utilizadas para selecionar cepas potencialmente probióticas, o que foi possível verificar nesse estudo, tendo em vista que o cultivo misto de probióticos mantiveram-se viáveis após a exposição ao trato gastrointestinal.

Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar

A avaliação da viabilidade do isolado *E. faecium* M7AN10 e do cultivo misto das bactérias lácticas foi realizada em uma matriz alimentar para cães. A contagem de *E. faecium* M7AN10 na matriz alimentar no t_0 foi de $8,09 \pm 0,06$ log UFC/mL. No t_1 a contagem foi de $8,07 \pm 0,02$ log UFC/mL e em t_2 foi de $8,07 \pm 0,10$ log UFC/mL (Figura 2). Houve um decréscimo na contagem de *E. faecium* M7AN10 presente na matriz alimentar, porém as concentrações não se mantiveram abaixo de 8 log UFC/mL. Já no cultivo misto, a contagem de bactérias na matriz alimentar no t_0 foi de $8,18 \pm 0,06$ log UFC/mL. No t_1 houve um aumento na contagem, sendo $8,55 \pm 0,08$ log UFC/mL, enquanto no t_2 , houve um decréscimo na contagem, de $8,44 \pm 0,10$ log UFC/mL (Figura 2).

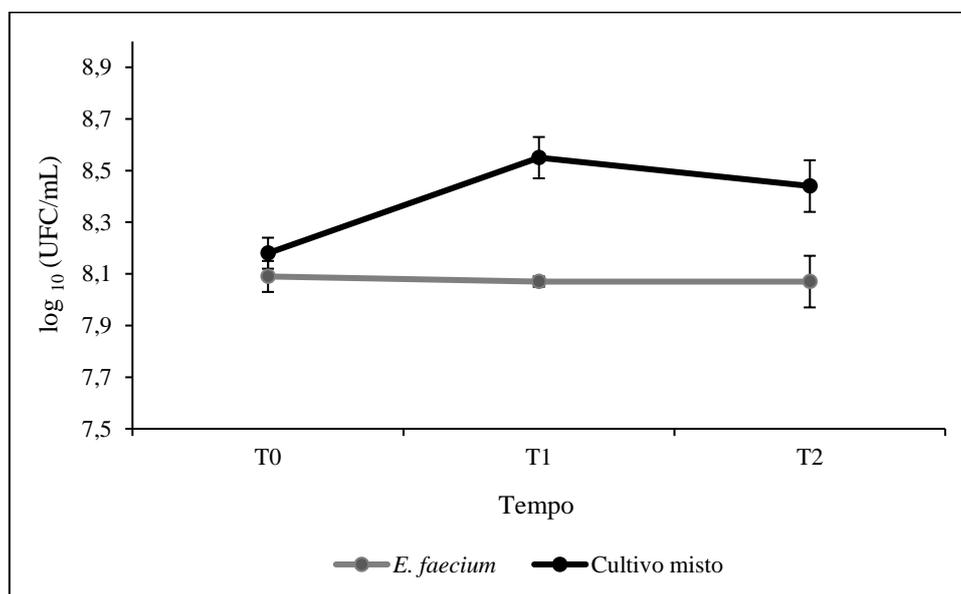


Figura 2. Viabilidade do cultivo misto de bactérias (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4) e do *E. faecium* M7AN10 em matriz alimentar canina.

Apesar da viabilidade das BAL ter sido observada por um período curto, é de extrema importância a manutenção da concentração de pelo menos 10^8 UFC/mL, visto que é o que preconiza a ANVISA para consumo diário de probióticos. Até então, não foram encontrados trabalhos realizando a inoculação de *E. faecium* em matriz alimentar para cães, então os resultados observados se mostram promissores para novas pesquisas serem realizadas. Contudo, no estudo de Vasconcelos (43) são descritos os probióticos comerciais destinados a cães e gatos, adicionados em formas farmacêuticas, encontrados no Brasil. O *E. faecium* encontra-se presente na composição de todos os probióticos comerciais listados.

Além disso, os probióticos também têm sido amplamente utilizados como suplemento na alimentação de frangos e suínos (44,45). Na medicina veterinária, existem evidências do benefício de alguns probióticos no tratamento da diarreia aguda e crônica, da atopia, da doença inflamatória intestinal e como potenciais moduladores imunológicos (46). Cao et al. (47), por exemplo, demonstraram que frangos alimentados com *E. faecium* tiveram uma melhora na morfologia intestinal e melhor desempenho no crescimento. Já Huang et al. (48) observaram que a suplementação de *E. faecium* na dieta de frangos de corte modulou a secreção de citocinas inflamatórias, aumentando a expressão de proteínas de adesão e mantendo a barreira intestinal contra a infecção de *E. coli* O78. Nos estudos de Taras et al. (49), verificou-se que o tratamento com o probiótico *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 diminuiu a mortalidade global pré-desmame de leitões de 16,2% em comparação com 22,3% no grupo de controle, além de reduzir o número de leitões com diarreia pós-desmame (no grupo probiótico foi de 21% em comparação com 38% no grupo de controle).

Destaca-se ainda que o isolado *E. faecium* M7AN10 já foi estudado anteriormente em outras matrizes alimentares destinadas a humanos. No trabalho desenvolvido por Kurtz et al. (6), o microrganismo foi encapsulado em alginato de sódio (2%) e sua viabilidade foi avaliada em leite UHT. Após 30 dias, a viabilidade desta cepa foi medida em 8 log UFC/mL. Além disso, os autores também avaliaram, por 30 dias, o isolado *E. faecium* M7AN10 encapsulado em bebida láctea comercial UHT sabor chocolate. No início do teste (tempo zero), $3,97 \pm 0,65$ log UFC/mL desta bactéria já havia sido liberada na bebida láctea achocolatada UHT; porém, no 30º dia, a contagem de células viáveis nesta matriz alimentar aumentou para $7,37 \pm 0,45$ log UFC/mL. De acordo com os autores, esses resultados demonstraram que as microcápsulas desempenharam um papel importante na manutenção da viabilidade de *E. faecium* M7AN10. Além disso, outras matrizes alimentares, além de leite e bebidas lácteas, podem receber probióticos. No estudo desenvolvido por Machado et al. (50), *E. faecium* foi adicionado na produção de queijo coalho. Após 20 dias o queijo coalho produzido com a inoculação de *E. faecium* apresentou contagem viável de BAL de $2,2 \times 10^7$ UFC/g, enquanto o queijo controle apresentou contagem viável de $5,4 \times 10^5$ UFC/g. Além disso, os autores verificaram que o queijo produzido com o probiótico apresentou algumas alterações nas características físico-químicas, como maior acidez titulável, menor pH e acentuado perfil de ácidos orgânicos, mantendo características importantes, como cor e aceitabilidade sensorial.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, *E. faecium* M7AN10 foi avaliado quanto ao seu potencial probiótico. A BAL foi considerada inócua, pois não apresentou atividade hemolítica e não possui atividade da enzima gelatinase. Além disso, apresentou suscetibilidade a diferentes antimicrobianos testados. O isolado apresentou atividade proteolítica, capacidade de produção de EPS e capacidade de autoagregação (33,50%). Ainda, o cultivo misto de *E. faecium* M7AN10, *Lactobacillus rhamnosus* LB 1.5 e *Lactobacillus paracasei* LB 6.4 demonstrou tolerância ao trato gastrointestinal.

Ao avaliar *E. faecium* M7AN10 e o cultivo misto em matriz alimentar para cães, ambos permaneceram na concentração 10^8 UFC/mL no período analisado, atendendo o que preconiza a ANVISA para consumo diário de probióticos. Contudo, sugere-se para estudos futuros que, a viabilidade das bactérias lácticas selecionadas em matriz alimentar, seja avaliada por um período maior. Apesar disso, os resultados obtidos neste estudo foram positivos para confirmar a utilização do *E. faecium* M7AN10 como potencial probiótico para cães.

Além disso, é inquestionável a necessidade de novas opções no mercado quando se trata de alimentos probióticos. Ressalta-se também a necessidade de uma legislação que defina quantidades diárias de probióticos na alimentação animal, pois atualmente tem-se utilizado os

limites determinados pela ANVISA, que se referem apenas a probióticos na alimentação humana. Dessa forma, é possível também exigir das empresas o fornecimento da dose mínima efetiva para um alimento animal ser considerado probiótico, o que atualmente não é viável.

REFERÊNCIAS

1. Wernimont SM, Radosevich J, Jackson MI, Ephraim E, Badri DV, Macleay JM, et al. The effects of nutrition on the gastrointestinal microbiome of cats and dogs: impact on health and disease. *Front Microbiol.* 2020;11:1266.
2. Schmitz SS. Value of probiotics in canine and feline gastroenterology. *Vet Clin North Am Small Anim Practic.* 2021;51(1):171-217.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Lista de Matérias-Primas - Ingredientes e Aditivos - Aprovados pelo MAPA para uso na Alimentação Animal. Brasília: MAPA; 2022.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Guia n° 21/2021 - versão 2. Brasília: ANVISA; 2021.
5. Brandalize CC. Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo [dissertação]. Campo Mourão (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2013.
6. Kurtz JP, Paim WP, Jantzen MM, Motta AS. The probiotic properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from buffalo milk: food matrix studies. *J Clin Nutr Food Sci.* 2021;4(1):17-29.
7. Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, Motta AS. Characterization of lactic acid bacteria in raw buffalo milk: a screening for novel probiotic candidates and their transcriptional response to acid stress. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2021;13(2):468-83.
8. Nhu NTK, Phan MD, Forde BM, Murthy AMV, Peters KM, Day CJ, et al. Complex multilevel control of hemolysin production by uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 2019;10(5):e02248-19.
9. Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, et al. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58(1):59-65.
10. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement (M100-S25). Wayne: CLSI; 2015.
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. Vaxjo: EUCAST; 2018.
13. Motta AS, Brandelli A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol.* 2002;92(1):63-70.

14. Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501[®], *Lactobacillus paracasei* IMC 502[®] and SYN BIO[®] against pathogens. *J Appl Microbiol.* 2014;117(2):518-27.
15. Raveschot C, Cudennec B, Deracinois B, Frémont M, Vaeremans M, Dugersuren J, et al. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: a multiparametric analysis. *Food Chem.* 2020;304:125415.
16. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.
17. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol.* 2000;31(6):438-42.
18. Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD, Abraham AG. Influence in inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT Food Sci Technol.* 2019;101:738-46.
19. Miles AA, Misra SS, Irwin J. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiol Infect.* 1938;38(6):732-49.
20. Dinçer E, Kivanç M. In vitro evaluation of probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish pastırma. *Arch Microbiol.* 2021;203(6):2831-41.
21. Fugaban JII, Holzapfel WH, Todorov SD. Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci. *Curr Res Microb Sci.* 2021;2:100070.
22. Tan Q, Xu HY, Aguilar ZP, Peng S, Dong SQ, Wang BG, et al. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough. *J Food Sci.* 2013;78(4):M587-93.
23. Ghattargi VC, Nimonkar YS, Burse SA, Davray D, Kumbhare SV, Shetty SA, et al. Genomic and physiological analyses of an indigenous strain, *Enterococcus faecium* 17OM39. *Funct Integr Genomics.* 2018;18:385-99.
24. Bindu A, Lakshmidevi N. Identification and in vitro evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. *Arch Microbiol.* 2021;203(2):579-95.
25. Kim YB, Seo HJ, Seo KW, Jeon HJ, Kim DK, Kim SW, et al. Characteristics of high-level ciprofloxacin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from retail chicken meat in Korea. *J Food Prot.* 2018;81(8):1357-63.
26. Amachawadi RG, Giok F, Shi X, Soto J, Narayanan SK, Tokach MD, et al. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* strains isolated from commercial probiotic products used in cattle and swine. *J Anim Sci.* 2018;96(3):912-20.

27. Slyvka I, Tsisaryk O, Musii L, Kushnir I, Kozirowski M, Kozirowska A. Identification and Investigation of properties of strains *Enterococcus* spp. Isolated from artisanal Carpathian cheese. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2022;39(1):102259.
28. Paula PLM. Caracterização tecnológica de *Enterococcus faecium* isolados de queijos artesanais [dissertação]. Londrina (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2019.
29. Huang Y, Ye K, Yu K, Wang K, Zhou G. The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2016;67:18-24.
30. Sharma P, Kaur S, Chadha BS, Kaur R, Kaur M, Kaur S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):39.
31. Rahmani M, Saffari F, Domann E, Zimmermann K, Langroudi L, Mansouri S. Enterococci as intestinal microbiota: investigation of characteristics and probiotic potential in isolates from adults and breast fed infants. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2022;14(6):1139-50.
32. Kordesedehi R, Taheri-Kafrani A, Rabbani-Khorasgani M, Kazemi R, Mutangadura D, Haertle T. Modification of IgE binding to α S1-casein by proteolytic activity of *Enterococcus faecium* isolated from Iranian camel milk samples. *J Biotechnol*. 2018;(276-7):10-4.
33. Sousa MA, Muller MP, Berghahn E, Souza CFV, Granada CE. New enterococci isolated from cheese whey derived from different animal sources: high biotechnological potential as starter cultures. *LWT Food Sci Technol*. 2020;131:109808.
34. Papadimitriou K, Venieraki A, Tsigkrimani M, Katinakis P, Skandamis PN. Whole-genome sequence data of the proteolytic and bacteriocin producing strain *Enterococcus faecalis* PK23 isolated from the traditional Halitzia cheese produced in Cyprus. *Data Brief*. 2021;38:107437.
35. Angelin J, Kavitha M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol*. 2020;162:853-65.
36. Song YR, Lee C-M, Lee S-H, Baik S-H. Evaluation of probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* M76 producing functional exopolysaccharides and its lactic acid fermentation of black raspberry extract. *Microorganisms*. 2021;9(7):1364.
37. Espeche MC, Pellegrino M, Frola I, Larriestra A, Bogni C, Nader-Matías MEF. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. 2012;18(1):103-9.
38. Zommiti M, Cambrone M, Maillot O, Barreau M, Sebei K, Feuilloley M, et al. Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal tunisian meat “Dried Ossban”. *Front Microbiol*. 2018;9(1685):1-12.
39. Santos KMO, Vieira AD, Salles HO, Oliveira JS, Rocha CR, Borges MF, et al. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):237-49.

40. Amaral DMF, Silva LF, Casarotti SN, Nascimento LCS, Penna ALB. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. J Dairy Sci. 2017;100(2):933-49.
41. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, Coppola R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from parmigiano reggiano cheese. FEMS Microbiol Lett. 2005;244:129-37.
42. Sornsenee P, Singkhamanan K, Sangkhathat S, Saengsuwan P, Romyasamit C. Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from fermented palm sap in Thailand. Probiotics Antimicrob Proteins. 2021;13(4):957-69.
43. Vasconcelos SSRL. Uso de probióticos manipulados e seus efeitos na saúde de cães e gatos: uma revisão de literatura [trabalho de conclusão de curso]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2018.
44. Reis TL, Vieites FM. Antibiotic, prebiotic, probiotic and symbiotic in feeds of broiler chickens and laying hens. Cienc Anim. 2019;29(3):133-47.
45. Oliveira CR, Mariani AB, Carvalho CL, Galli GM, Andretta I. Produção animal e vegetal: inovações e atualidades. OrLândia: Agron Food Academy; 2021. Uso de probióticos na produção de suínos: revisão. Cap. 71.
46. Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, Lappin MR. Effect of *Enterococcus faecium* Strain SF68 on gastrointestinal signs and fecal microbiome in cats administered amoxicillin-clavulanate. Top Companion Anim Med. 2017;32:104-8.
47. Cao GT, Zeng XF, Chen AG, Zhou L, Zhang L, Xiao YP, et al. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. Poult Sci. 2013;92(11):2949-55.
48. Huang L, Luo L, Zhang Y, Wang Z, Xia Z. Effects of the dietary probiotic, *Enterococcus faecium* NCIMB11181, on the Intestinal Barrier and System Immune Status in *Escherichia coli* O78-challenged broiler chickens. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019;11:946-56.
49. Taras D, Vahjen W, Macha M, Simão Ó. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. J Anim Sci. 2006;84:608-17.
50. Machado TOX, Mesquita RVSC, Silva VO, Araújo MB, Oliveira APD, Souza JV, et al. Effect of the application of probiotic strains of *Enterococcus faecium* on the physicochemical and sensory characteristics of coalho cheese. Semin Cienc Agrar. 2021;42(1):167-78.

Recebido em: 17/11/2023

Aceito em: 10/01/2024