

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

FERNANDA GENEHR DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium* M7AN10
EM MATRIZ ALIMENTAR PARA CÃES**

Porto Alegre

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium* M7AN10
EM MATRIZ ALIMENTAR PARA CÃES**

Autora: Fernanda Genehr de Carvalho

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda de
Souza da Motta**

**Co-orientadora: Ma. Priscila Ribeiro
Jankoski**

Porto Alegre

2022

FERNANDA GENEHR DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium* M7AN10 EM
MATRIZ ALIMENTAR PARA CÃES

Aprovado em 03 OUT 2022

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a Amanda de Souza da Motta – Orientadora
Orientadora e Presidente da Comissão

Ma. Gabriela Merker Breyer
Membro da Comissão

Ma. Leticia Fontoura Moreira
Membro da Comissão

Dedico este trabalho ao meu marido, Gustavo, e ao nosso grande amor que está a caminho.

Dedico também aos anjos caninos que estão em minha vida, Olívia, Gaya e Sofia; e aos que não estão mais, Gwen, Nenê e Marie.

Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, uma universidade pública, gratuita e que oferece um ensino de qualidade, bem como seus servidores, professores e terceirizados.

À minha mãe, Flávia, que sempre me incentivou a seguir por esse caminho, mesmo quando eu não acreditava que era o correto. Obrigada pelos conselhos, desabafos, amizade e por tanto carinho. Sem a tua força eu não teria ido tão longe.

À minha família, Gustavo, Kiko, Marcela e Manu, por acreditarem em mim e serem meu alicerce, mesmo quando precisei me afastar. À Giselda, Ivsen e Bruno, por me apoiarem e sempre se preocuparem tanto comigo. Obrigada por terem tornado toda a minha graduação possível.

À minha orientadora, Amanda de Souza da Motta, pelos ensinamentos, paciência, correções e, principalmente, pelas oportunidades dentro do laboratório.

À minha Co-orientadora, Priscila Ribeiro Jankoski, pela parceria, aprendizado, cumplicidade, amizade e confiança. Obrigada por me auxiliar, tranquilizar e deixar esse projeto tão lindo.

Às minhas colegas de laboratório, Andréia e Vitória, que me auxiliaram nas dificuldades diárias e tornaram a rotina mais leve.

Às minhas colegas de faculdade, Dora, Ana e Kendra, por estarem ao meu lado nos piores e melhores momentos da graduação. O apoio de vocês foi indispensável.

À minha colega de faculdade, de laboratório e irmã de alma, Nathasha, que desde o início me auxiliou incansavelmente a buscar uma pesquisa de qualidade e a produzir um trabalho de forma excelente. Obrigada pela amizade, apoio e companhia diária durante o final da graduação.

Agradeço a Deus, por me guiar nos momentos difíceis e por não me deixar desistir, mesmo quando esse se mostrava o caminho mais fácil.

Por fim, a todos os colegas e parceiros que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

Aditivos probióticos possuem grande impacto na saúde de cães, pois sabe-se que é comum ocorrer casos de disbiose. É pouco abordado que essa disbiose também afeta a saúde de outros sistemas, podendo levar à elevação da propensão de doenças, e por isso tem se utilizado cada vez mais probióticos para manter uma microbiota saudável. Atualmente no mercado há poucas opções de alimentos completos com probióticos em sua composição, sendo elas rações secas com baixa dosagem do aditivo. Por isso foi levantada a hipótese de adicionar probióticos em matriz alimentar canina (ração úmida). O isolado escolhido foi o *Enterococcus faecium* M7AN10, o qual avaliou-se sua inocuidade, seu potencial probiótico e sua viabilidade ao ser inoculado em matriz alimentar canina. Os resultados quanto à inocuidade apresentaram ausência de atividade hemolítica e de gelatinase. Foi observada a atividade proteolítica, bem como a suscetibilidade a diversos antimicrobianos, também comprovando sua inocuidade. Ainda, a bactéria *E. faecium* resistiu de forma constante quando submetida ao trato gastrointestinal *in vitro* em conjunto com a *Lactobacillus rhamnosus* LB 1.5 e a *Lactobacillus paracasei* LB 6.4. *E. faecium* demonstrou produção de exopolissacarídeos e capacidade de auto-agregação. Contudo, a bactéria em questão não apresentou atividade antimicrobiana frente a patógenos de interesse na medicina veterinária, porém se manteve viável quando inoculada em matriz alimentar canina durante o período de oito dias. Com base nesses resultados, o isolado em questão, *E. faecium* M7AN10, é 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.

ABSTRACT

Probiotics additives have a great impact in canine health and animal welfare, for their known predisposition to develop dysbiosis. However, it's not widely debated that dysbiosis can also affect other systems, and can actually increase the likelihood of contracting other diseases. Therefore, the use of probiotics has increased to help maintain a healthy microbiota. There is only a few currently available canine whole foods in the market containing probiotics in its composition, usually being dry food with a lower dosage of probiotics than the recommended. Therefore, the hypothesis of adding probiotics to canine matrix food (wet food) was raised. The studied strain in this work is the *Enterococcus faecium* M7AN10 and tests were performed to assess its innocuity, its probiotic potential and its viability when inoculated in canine wet food. The results related to innocuity showed absence of hemolytic and gelatinase activity. *E. faecium* presented proteolytic activity and great susceptibility to several antimicrobial drugs. *E. faecium* also proved to be resistant to the gastrointestinal tract when inoculated in conjunction with *Lactobacillus rhamnosus* LB 1.5 and *Lactobacillus paracasei* LB 6.4. *E. faecium* exhibited the production of exopolysaccharides and the capacity to auto-aggregation. *E. faecium* it didn't showed antimicrobial activity against the bacterial pathogens analyzed in this study, however it remained viable when inoculated in canine matrix food for eight days. The results of this experiment indicated that the *E. faecium* M7AN10 is a potential probiotic candidate to be used as additive in canine diets.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Cultivos isolados em placa, sendo elas *Enterococcus faecium* M7AN10 (A), *Lactobacillus rhamnosus* LB 1.5 (B) e *Lactobacillus paracasei* LB 6.4 (C). 25
- Figura 2** – Avaliação da atividade hemolítica de *Enterococcus faecium* M7AN10 (B, C e D) e da cepa controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A).....31
- Figura 3** – Atividade proteolítica presente no isolado *Enterococcus faecium* M7AN10 (E1, E2 e E3) e na cepa controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1, C2 e C3).
.....33
- Figura 4** – Concentração de bactérias viáveis após a exposição ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo.36
- Figura 5** – Estabilidade das bactérias lácticas em matriz alimentar canina.38
- Figura 6** – Microdiluições de 10^{-1} a 10^{-6} : alimento contendo *Enterococcus faecium* M7AN10 (A), cultivo misto (B) e grupo controle (C).38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Suplementos probióticos comerciais para cães.	24
Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade de <i>Enterococcus faecium</i> M7AN10.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactéria Ácido-Láctica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EPS	Exopolissacarídeo
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
g	Grama
HCl	Ácido clorídrico
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OD	<i>Optical density</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
rpm	Rotações por minuto
SGS	Suco gástrico simulado
SIS	Suco intestinal simulado
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Probióticos	18
2.2	Bactérias usadas como probióticos	19
2.2.1	<i>Enterococcus faecium</i>	19
2.2.2	Outras bactérias lácticas	20
2.3	Alimentos probióticos e prebióticos na área pet	21
2.4	Uso do probiótico como terapia adjuvante na clínica veterinária	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Microrganismos e condições de cultivo	25
3.2	Preparo do cultivo misto de bactérias	25
3.3	Avaliação da inocuidade de <i>Enterococcus faecium</i> M7AN10	26
3.3.1	Avaliação da atividade hemolítica	26
3.3.2	Avaliação da atividade de gelatinase	26
3.3.3	Avaliação da atividade enzimática	26
3.3.4	Suscetibilidade aos antimicrobianos	27
3.4	Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i> das bactérias ácido-lácticas selecionadas	27
3.4.1	Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeo	27
3.4.2	Avaliação da capacidade de auto-agregação	28
3.4.3	Tolerância do cultivo misto de probióticos ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo	28
3.5	Avaliação da atividade antimicrobiana de <i>Eenterococcus faecium</i> M7AN10 frente a bactérias patogênicas	29
3.6	Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Avaliação da inocuidade de <i>Enterococcus faecium</i> M7AN10	31

4.1.1	Avaliação da atividade hemolítica	31
4.1.2	Avaliação da atividade de gelatinase	32
4.1.3	Avaliação da atividade enzimática	32
4.1.4	Suscetibilidade aos antimicrobianos	33
4.2	Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i> das bactérias ácido-lácticas selecionadas	34
4.2.1	Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeos	34
4.2.2	Avaliação da capacidade de auto-agregação	35
4.2.3	Tolerância do cultivo misto de probióticos ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo.....	36
4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> M7AN10 frente a bactérias patogênicas	37
4.4	Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar.....	37
5	CONCLUSÃO.....	39
6	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Muitos cães sofrem de doenças gastrointestinais decorrentes de patógenos ou mesmo alimentação. É comum se 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 (WERNIMONT *et al.*, 2020).

Dentro das opções que encontramos comercialmente, há apenas alimentos secos (rações) que contenham 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 (2021) 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.

Dentre os microrganismos utilizados como probióticos regulamentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), podemos citar *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*. São 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. Por conta disso, são utilizados os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que prevê doses entre 10^8 e 10^9 UFC/g a ser consumido diariamente.

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 (BRANDALIZE, 2013). O isolado *Enterococcus faecium* M7AN10, utilizado nesse estudo, já possui potencial probiótico comprovado *in vitro* nas condições experimentais estudadas (KURTZ *et al.*, 2020).

Em formulações comerciais, o mais comum é encontrar associação de diferentes bactérias. 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 (BREYER *et al.*, 2020), para associar-se com o *E. faecium* M7AN10.

Dentro deste cenário, se mostra indispensável a busca por novos alimentos completos que contenham doses adequadas de bactérias probióticas para serem utilizadas tanto na alimentação diária de cães, como adjuvante em tratamentos clínicos. Este estudo buscou estudar o isolado *E. faecium* M7AN10 como candidato probiótico, explorando sua aplicação em matriz alimentar canina.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo buscar a proposição de um alimento probiótico para cães, utilizando o isolado *Enterococcus faecium* M7AN10 em matriz de alimento úmido canino.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliação da inocuidade do isolado bacteriano *Enterococcus faecium* M7AN10;
- Avaliação da atividade probiótica *in vitro* de um cultivo misto contendo *E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4 no trato gastrointestinal em fluxo contínuo;
- Aplicação e avaliação da viabilidade dos isolados bacterianos estudados (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4) em matriz alimentar canina (alimento úmido).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Probióticos

Probióticos são microrganismos, normalmente bactérias e leveduras, que, quando administrados nas quantidades adequadas, podem conferir benefícios à saúde. Para isso, é necessário realizar uma comprovação da sua identidade, da sua segurança e dos benefícios que traz ao hospedeiro (ANVISA, 2021). Com relação a seu uso em animais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define como probiótico, na instrução normativa nº 44, regulamentada em 15 de dezembro de 2015, “cepas de microrganismos vivos (viáveis), que agem como auxiliares na reposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para seu equilíbrio”.

Para a comprovação da segurança, ou seja, da inocuidade do microrganismo, alguns parâmetros são avaliados, como a suscetibilidade à antimicrobianos. Outras características que garantem a inocuidade de uma bactéria, por exemplo, são a ausência de atividade hemolítica e de genes de virulência (KURTZ *et al.*, 2020). Ainda, as atividades hemolítica e de gelatinase contribuem como fatores de virulência, e representam um perigo para a saúde (TSIGKRIMANI *et al.*, 2022). Além de garantir a inocuidade do microrganismo, é necessário que ele cumpra determinados requisitos, como resistir ao trato gastrointestinal, onde é simulado *in vitro* um estresse ácido, básico e de sais biliares, e se busca avaliar a sobrevivência do inóculo. Também é de grande interesse possuir habilidades de adesão e auto-agregação, o que confere a capacidade de colonizar o epitélio intestinal e promover seus benefícios (BREYER *et al.*, 2020).

Outra determinação a ser cumprida para garantir a eficiência de um probiótico é a presença de um número satisfatório de células viáveis no momento do consumo. Geralmente a dose terapêutica mínima diária é entre 10^8 e 10^9 células viáveis, correspondendo a 100 gramas de produto contendo 10^6 a 10^7 células viáveis por grama (SAAD, 2006). Ressalta-se a importância do consumo regular para que se obtenha os benefícios desejados, uma vez que a colonização destes microrganismos ingeridos não é permanente, mas sim transitória (GOMES, MALCATA, 1999). Esses dados vão ao encontro com a determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estipula na instrução normativa nº 28, regulamentada em 26

de julho de 2018, que a quantidade mínima viável deva ser entre 10^8 e 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC), a ser consumida diariamente.

Os probióticos podem agir de diversas formas, dentre elas a competição por sítios de adesão que bactérias patogênicas ocupariam no intestino, ou mesmo na exclusão competitiva (SAAD, 2006). Ainda, podem atuar modulando a microbiota, agindo como uma barreira na mucosa intestinal impedindo a colonização por bactérias patogênicas. Também podem agir no sistema imune, visto que mais de 70% das células imunes estão localizadas a nível de intestino (BUTEL, 2014). Além dos benefícios mais conhecidos, podemos citar também a redução da inflamação e melhora da homeostase da glicose, importante para pacientes diabéticos (WIEËRS *et al.*, 2020).

2.2 Bactérias usadas como probióticos

Os principais gêneros de bactérias utilizados como probióticos na medicina veterinária regulamentados pelo MAPA são *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* (BRASIL, 2021). As bactérias ácido-lácticas (BAL) são muito utilizadas na produção de alimentos tanto pela sua ação conservante, pois acidificam o meio, quanto pela sua capacidade de melhorar o sabor, a textura e o valor nutricional (ILHA, 2015).

É importante ressaltar a mudança taxonômica que ocorreu com algumas espécies dentro do gênero *Lactobacillus*. ZHENG *et al.* (2020) propuseram a subdivisão de 261 espécies em 25 gêneros, dentre eles o *Lacticaseibacillus*, que engloba as bactérias *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, ambas utilizadas neste trabalho. Essa divisão se deu para melhor agrupar as espécies conforme suas características genotípicas, fenotípicas e ecológicas.

2.2.1 *Enterococcus faecium*

As espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. são cocos ovais Gram-positivas e anaeróbias facultativas. Estão presentes colonizando intestinos de humanos e animais domésticos, bem como no ambiente (PAULA, 2019). Ainda, são microrganismos mesófilos, cuja temperatura ideal para crescimento varia entre 10°C e 45°C. Podem tolerar altas concentrações de sais (até 6,5%) e uma

variação de pH entre 4,4 e 9,6. Ao contrário de outros grupos de bactérias probióticas, o grupo *Enterococcus* é composto por microrganismos patogênicos e comensais (DINÇER, KIVANÇ, 2021), contudo há isolados não patogênicos que são amplamente utilizados como probióticos, devido às suas características (MAPA, 2022).

Uma característica importante deste grupo de bactérias e que tem grande importância em sua utilização como probiótico é a produção de bacteriocinas, as enterocinas, que são capazes de inibir diversos patógenos de importância alimentar e clínica (MORENO *et al.*, 2002). Além disso, o *Enterococcus faecium* se destaca por ser colonizador do trato gastrointestinal, sendo indispensável no tratamento de diarreias e pela capacidade de agir no sistema enzimático hepático, reduzindo o colesterol LDL (*low density lipoprotein*) (BRANDALIZE, 2013).

Como probiótico, o *Enterococcus faecium* é um microrganismo comercialmente disponível e aprovado para uso em cães (MAPA, 2022). Foi relatado que seu uso induz variações nas concentrações séricas de cobalamina e folato em cães saudáveis (LUCENA *et al.*, 2019). Em outro estudo, Rose *et al.* (2017) avaliaram a eficácia desta bactéria como coadjuvante no tratamento de diarreia em cães saudáveis em um abrigo de animais, diminuindo significativamente a incidência desta condição. A suplementação foi realizada na quantidade de 2×10^9 UFC/dia.

2.2.2 Outras bactérias lácticas

A bactéria *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva amplamente utilizada como probiótico por pertencer ao gênero *Lactobacillus* spp. (LOPES, 2016). Por sua vez, a bactéria *Lactobacillus paracasei*, uma bactéria que também é Gram-positiva, é amplamente encontrada em marcas comerciais de leites fermentados e outros produtos lácteos (OLIVEIRA, 2009).

Ambas as bactérias probióticas são encontradas no leite de búfala não pasteurizado (BREYER *et al.*, 2020) e de forma abundante na mucosa intestinal humana (LOPES, 2016), por exemplo. A temperatura ótima de crescimento das bactérias *L. rhamnosus* e *L. paracasei* varia entre 30°C e 40°C e o pH ideal para esse crescimento é igual ou menor que 5,0. São bactérias microaerófilas ou anaeróbias facultativas, cujos efeitos benéficos estão relacionados principalmente pela modulação da população e atividade da microbiota intestinal (LOPES, 2016).

2.3 Alimentos probióticos e prebióticos na área pet

Há atualmente no mercado opções de alimentos secos para cães com suplementação de probióticos em sua composição. Como exemplo, temos a ração da *Wellness Complete Health* (*Wellness Pet Company, Inc.*, Tewksbury, MA, EUA), alimento completo produzido nos Estados Unidos e suplementado com *E. faecium*, além de outras bactérias probióticas. A concentração de bactérias usadas nesta ração é de pelo menos 2×10^7 UFC/lb, o que representa pouco mais de $4,4 \times 10^4$ UFC/g. No Brasil dispomos, por exemplo, da ração Equilíbrio Total Sensitive (ADM, Chicago, IL, EUA), onde os níveis de garantia apontam uma presença de pelo menos 4×10^4 UFC/g. Como não há regulamentação sobre concentração mínima de probióticos em alimentos para cães, os parâmetros utilizados nesse estudo foram as recomendações de consumo da ANVISA, com isso ressaltando a contagem consideravelmente baixa dos alimentos ofertados no mercado. Em um estudo realizado com 19 alimentos comerciais para cães e gatos, nenhum dos alimentos testados possuía todos os microrganismos probióticos alegados e mais de 25% dos alimentos, não apresentaram um crescimento bacteriano relevante (SCHMITZ, 2021).

Com relação à produção, o *kibble* de ração passa pelo processo de extrusão, que ocorre a temperaturas que variam entre 150°C e 160°C. Essa temperatura elimina microrganismos que possam contaminar o alimento, mas também inviabilizam as bactérias probióticas. Esse, somado a fatores relacionados às ações adversas do ambiente, são fatores que reduzem a viabilidade dos probióticos em alimentos secos (RODRIGUES, 2018).

Outro aditivo possível de se utilizar na alimentação de cães para auxiliar a microbiota benéfica são os prebióticos. Conforme o MAPA, na instrução normativa nº 13 regulamentada em 30 de novembro de 2004, é definido como prebiótico “ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentados pela microbiota do trato digestório dos animais contribuindo para seu equilíbrio”. Os prebióticos utilizados atualmente são carboidratos não-digeríveis, dos quais se sobressai a inulina e oligossacarídeos, que fornecem carboidratos que bactérias benéficas do intestino são capazes de fermentar (SAAD, 2006).

Na alimentação de cães, para realizar a extrusão dos *kibbles* de ração, é comum a utilização de amido. O amido, por ser de rápida digestão, pode gerar picos de insulina e obesidade. Reis *et al.* (2017) identificaram em seu estudo a presença de

amido resistente, que é uma fração do amido que não é degradado durante a digestão e chega ao cólon, onde atua como substrato para a microbiota local. Os autores demonstram a funcionalidade do amido resistente como auxiliar no processo de extrusão e salienta sua função prebiótica, por não sofrer hidrólise enzimática e participar de processos fermentativos. Infelizmente, de forma comercial, os prebióticos também são encontrados majoritariamente em forma de suplementos.

Até o presente momento, não foi encontrada uma opção de alimento úmido canino que contenha probiótico em sua composição.

2.4 Uso do probiótico como terapia adjuvante na clínica veterinária

A qualidade da microbiota intestinal cumpre um papel importante na saúde de cães, pois está diretamente relacionada ao sistema imune e na defesa contra patógenos. Cães com problemas gastrointestinais tanto agudos quanto crônicos, apresentam alterações importantes na microbiota intestinal, quando comparados a animais saudáveis (GUARD *et al.*, 2014). As alterações gastrointestinais em cães podem ter origem alimentar ou ocorrem em decorrência de algum patógeno, como *Escherichia coli*, e podem ser ou não, autolimitantes. Nesse cenário, a utilização de probióticos como o *E. faecium* já se mostrou benéfico, melhorando a saúde gastrointestinal de cães a partir da modulação de sua microbiota (GÓMEZ-GALLEGO *et al.*, 2016).

Na medicina de pequenos animais, são muito utilizadas medicações como os anti-inflamatórios (como corticoides) para o tratamento de cães, que indiretamente alteram a composição de sua microbiota (WHITE *et al.*, 2017). Sabendo-se disso, a medicina veterinária pode se beneficiar do uso de probióticos na sua rotina. Algumas opções comerciais de probióticos que podemos utilizar estão listadas na Tabela 1.

Além das alterações que ocorrem diretamente no trato gastrointestinal, uma mudança da microbiota também pode interferir em outros sistemas, como citado por Wernimont *et al.* (2020): a disbiose impacta na saúde renal, pois a composição da microbiota está relacionada com a suscetibilidade individual de desenvolvimento de doença renal crônica. Outro sistema afetado é o endócrino, que conforme os autores há relação direta entre disbiose e ocorrência de diabetes *mellitus* tipo 1, além de também impactar na predisposição a obesidade. Por fim, segundo os autores, há relação entre doenças periodontais, como periodontite e gengivite, e uma microbiota

com prevalência de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium canis*.

A adição de probióticos na alimentação de cães pode reduzir a necessidade de antibióticos, o que também auxilia na manutenção da microbiota intestinal; além disso, produtos com suplementação probiótica pode ainda auxiliar a melhora da consistência das fezes em períodos de diarreia e reduzir a quantidade de patógenos no intestino, melhorando o bem-estar e promovendo uma recuperação mais acelerada (GÓMEZ-GALLEGO *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Suplementos probióticos comerciais para cães.

Nome comercial (fabricante)	Cepas	Dosagem	Fonte
Lactobac Dog® (Organnact) Cães Seringa dosadora com 16 g	<i>Bacillus subtilis</i>	9,6x10 ⁷ UFC/g	https://www.organnact.com.br/produto/para-seu-pet/lactobac-dog/
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	9,6x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Enterococcus faecium</i>	1,9x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,4x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Lactobacillus casei</i>	1,9x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Lactobacillus lactis</i>	1,4x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,4x10 ⁷ UFC/g	
Probiótico para Cães e Gatos® (Vetnil) Cães e gatos Seringa dosadora com 14 g	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3,33x10 ⁷ UFC/g	https://vetnil.com.br/produto/probiotico-r-vetnil-caes-e-gatos
	<i>Enterococcus faecium</i>	1,66x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,33x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,66x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,33x10 ⁵ UFC/g	
FloraFix® (Vencofarma) Cães e Gatos Seringa dosadora com 15 g	<i>Bifidobacterium longum</i>	1x10 ⁷ UFC/g	https://www.petlove.com.br/reposicao-de-microbiota-intestinal-flora-fix-vencofarma/p
	<i>Enterococcus faecium</i>	1x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1x10 ⁷ UFC/g	
	<i>Lactobacillus casei</i>	1x10 ⁷ UFC/g	
Biocanis Probiótico (Ouro Fino) Cães e gatos Seringa com 14 g	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,33x10 ⁶ UFC/g	https://www.ourofino.com.br/produtos/suplementos/biocanis/
	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	3,33x10 ⁶ UFC/g	
	<i>Enterococcus faecium</i>	3,33x10 ⁶ UFC/g	
Probsil (Vansil) Cães e gatos Seringa dosadora com 14 g	<i>Bacillus subtilis</i>	2x10 ⁸ UFC/g	http://vansilsaudeanimal.com/produto/prob-sil/
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Enterococcus faecium</i>	2x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3x10 ⁸ UFC/g	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3x10 ⁸ UFC/g	
Biosan Flora (Biosan) Cães e gatos Seringa dosadora com 14 g	<i>Bacillus subtilis</i>	3x10 ¹⁰ UFC/kg	http://biosan.ind.br/produtos/biosan-flora-b12/
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2x10 ¹⁰ UFC/kg	
	<i>Enterococcus faecium</i>	2x10 ¹⁰ UFC/kg	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2x10 ¹⁰ UFC/kg	
	<i>Lactobacillus casei</i>	2x10 ¹⁰ UFC/kg	
	<i>Lactobacillus lactis</i>	1x10 ¹⁰ UFC/kg	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8x10 ¹⁰ UFC/kg	

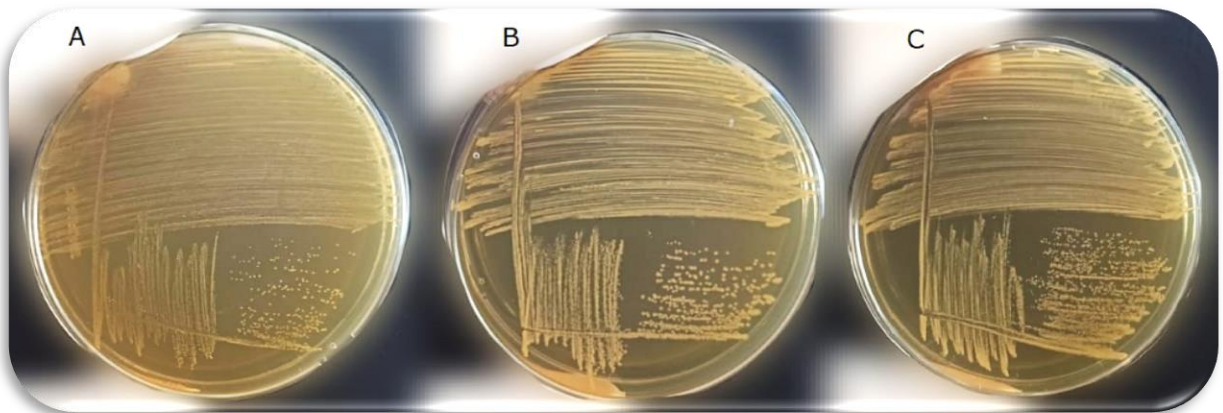
Fonte: Autoria própria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

O trabalho foi desenvolvido com três bactérias ácido-lácticas isoladas de leite de búfala, *Enterococcus faecium* M7AN10, *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5, previamente identificadas (BREYER *et al.*, 2020; KURTZ *et al.*, 2020). Para o estudo, os isolados foram mantidos estocados em caldo MRS com glicerol 20% e armazenados a - 20°C. Para a reativação, os isolados foram transferidos para tubos contendo 3 mL de caldo *Mann, Rogosa and Sharpe* (MRS) e incubados à temperatura de 30°C por 48 horas. Após seu crescimento, foram semeados por esgotamento em placas com ágar MRS e incubados a 37°C por 48 horas. A pureza das colônias foi avaliada através de coloração de Gram.

Figura 1 – Cultivos isolados em placa, sendo elas *Enterococcus faecium* M7AN10 (A), *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 (B) e *Lacticaseibacillus paracasei* LB 6.4 (C).



Fonte: autoria própria.

3.2 Preparo do cultivo misto de bactérias

Para este preparo, os isolados foram cultivados em ágar MRS a 37°C por 48 horas e, em seguida, transferidos individualmente para tubos contendo 5 mL caldo MRS, sendo incubados a 37°C por 24 horas. 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 horas. Este cultivo misto foi utilizado para avaliar a

tolerância ao trato gastrointestinal e sua viabilidade ao ser inoculado em matriz de alimento úmido canino.

3.3 Avaliação da inocuidade de *Enterococcus faecium* M7AN10

3.3.1 Avaliação da atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica, o isolado *E. faecium* M7AN10 foi semeado em placas de ágar *Columbia Blood Base* suplementado com 5% de sangue de carneiro, e incubados a 30°C por 48 horas. As placas de ágar sangue foram examinadas para determinar sinais ou não de halos ao redor das colônias, sugerindo hemólise dos eritrócitos (NHU *et al.*, 2019). A atividade hemolítica foi classificada em α -hemólise (halos esverdeados, hemólise parcial), β -hemólise (halos claros, hemólise total) e γ -hemólise (sem a presença de halos, ausência de atividade hemolítica). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo a 37°C por 48 horas.

3.3.2 Avaliação da atividade de gelatinase

Para avaliar a atividade de gelatinase, o isolado foi inoculado pela técnica de picada em tubos de ensaios contendo ágar gelatina (peptona bacteriológica, extrato de carne e gelatina 12%). Os tubos foram incubados a 30°C por 48 horas e colocados na geladeira à 4°C por 30 minutos, após o período de incubação.

Para a interpretação, se a gelatina permanecesse sólida, o teste seria considerado negativo para produção da gelatinase. Se a gelatina se apresentar liquefeita, a prova deverá ser considerada positiva (MARRA *et al.*, 2007). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo.

3.3.3 Avaliação da atividade enzimática

A determinação da atividade proteolítica foi avaliada com o meio ágar leite. O isolado *E. faecium* M7AN10 foi cultivado em ágar MRS a 37°C durante 48 horas. Após, foi inoculado pela técnica de picada em ágar leite 10% em triplicata e a placa foi incubada a 30°C durante 48 horas. 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 (RAVESCHOT *et al.*, 2020). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo incubado a 37°C por 48 horas.

3.3.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade de *E. faecium* M7AN10 aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão, como preconiza o método Kirby-Bauer (1966). Para realização desse ensaio, o microrganismo foi cultivado em ágar MRS e incubados a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, o isolado foi transferido para um tubo de ensaio contendo solução salina 0,85% e ajustado de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A seguir, a suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton, em três direções, com o auxílio de um suabe estéril. Os discos de antibiótico foram distribuídos sobre as placas de forma equidistante, e em seguida foram incubadas a 30°C por 24 horas, para a avaliação dos halos de inibição. Os antibióticos utilizados foram: Ampicilina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Eritromicina (15 µg), Estreptomicina (300 µg), Gentamicina (10 µg), Linezolida (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Norfloxacinina (10 µg), Tetraciclina (30 µg) e Vancomicina (µg). Para interpretar os resultados, foram utilizados como referência o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

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

3.4.1 Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeo

A capacidade de produção de exopolissacarídeo (EPS) do *E. faecium* M7AN10 foi avaliada com o meio Vermelho Congo, conforme metodologia descrita por Freeman *et al.* (1989). O isolado *E. faecium* M7AN10 foi cultivado em ágar MRS a 37°C durante 48 horas. Após, foi semeado pela técnica de esgotamento em placa contendo o meio Vermelho Congo e incubado à 37°C por 48 horas. Os resultados

positivos foram determinados com base na formação de colônias pretas com consistência seca e cristalina, enquanto os não produtores de exopolissacarídeo formam colônias rosadas. A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo incubado a 37°C por 24 horas e o isolado *Bacillus altitudinis* 1.4 foi utilizada como controle negativo incubado a 37°C por 24 horas.

3.4.2 Avaliação da capacidade de auto-agregação

A capacidade de auto-agregação de *E. faecium* M7AN10 foi analisada através da metodologia descrita por Del Re *et al.* (2000) com modificações. Inicialmente, o isolado foi cultivado em caldo MRS a 37 °C por 24 horas e centrifugado a 7.000x g por 15 minutos, para obtenção do precipitado de células. Foram realizadas duas lavagens com PBS 1x (pH 7,0), para retirar qualquer resíduo de meio de cultivo. Os precipitados foram então ressuspensos em 5 mL de PBS 1x (pH 7,0), homogeneizados em vórtex, e incubados a temperatura ambiente por 5 horas.

Para avaliar a capacidade de autoagregação do isolado, avaliou-se individualmente durante o período de incubação da suspensão celular. Foram retiradas alíquotas de 100 µL nos tempos: inicial (t_0), 1 hora (t_1), 2 horas (t_2), 3 horas (t_3), 4 horas (t_4) e 5 horas (t_5). Cada alíquota foi transferida para um tubo contendo 3,9 mL de PBS 1 X (pH 7,0), e analisada em espectrofotômetro Hitachi U-1100, para determinação da densidade óptica a 600 nm (OD_{600}).

A capacidade de auto-agregação foi determinada pelo cálculo a seguir, onde A_t representa a absorvância em t_1 , t_2 , t_3 , t_4 e t_5 , e A_0 representa o tempo inicial.

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

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

Para este estudo, foi utilizado um cultivo misto de bactérias contendo *E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4. 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) (IRAPORDA *et al.*, 2019).

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

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

Para a determinação da atividade antimicrobiana de *E. faecium* M7AN10 a técnica da gota foi empregada (MOTTA, BRANDELLI, 2002). Foi obtido o sobrenadante livre de células a partir do inóculo de *E. faecium* M7AN10 a 1% cultivado em caldo MRS e incubado a 30°C por 24 horas. Foi utilizado um cultivo de *E. faecium* M7AN10 em placa MRS incubada a 37°C por 48 horas. 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 horas 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.

3.6 Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar

Para a avaliação da sobrevivência das culturas probióticas o cultivo misto das bactérias lácticas (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4) e o *E. faecium* isolado foram inoculados em uma matriz alimentar para cães (ração úmida) com 8% de umidade, previamente esterilizada. O inóculo inicial de 10^8 UFC/mL foi preparado em caldo MRS e adicionado nesta matriz para a avaliação da viabilidade celular deste cultivo ao longo de 8 dias. O grupo controle do alimento foi realizado utilizando salina 0,85% previamente esterilizada, realizando contagens a cada ponto coletado. Alíquotas de 100 μ L foram coletadas no tempo 0 (t_0), tempo 1 (t_1) e tempo 2 (t_2), espaçados em intervalos de 4 dias. Para cada alíquota, foram realizadas 6 microdiluições (MILES *et al.*, 1938). As diluições foram inoculadas em placa PCA (*Plate Count Agar*) e incubado à 37°C por 48 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

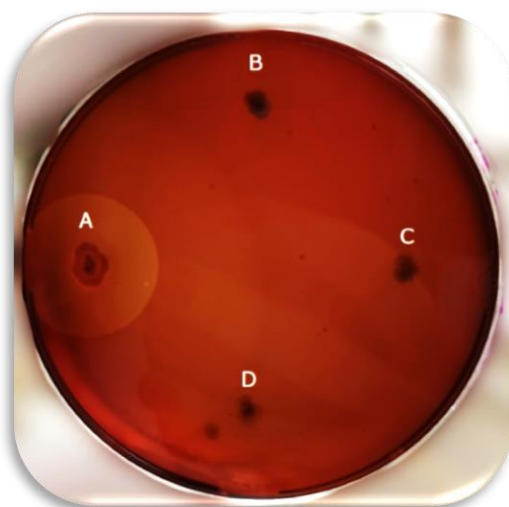
4.1 Avaliação da inocuidade de *Enterococcus faecium* M7AN10

4.1.1 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica de uma bactéria pode ser classificada em α -hemólise (quando há coloração esverdeada ao redor das colônias), β -hemólise (formação de halo claro ao redor das colônias) e γ -hemólise (sem coloração ou formação de halo), que indica a ausência de hemólise (TSIHKRIMANI *et al.*, 2022).

A bactéria candidata a probiótico *E. faecium* M7AN10 não apresentou atividade hemolítica, ou seja, apresentou γ -hemólise. A cepa controle, *S. aureus* ATCC 25923, apresentou β -hemólise, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Avaliação da atividade hemolítica de *Enterococcus faecium* M7AN10 (B, C e D) e da cepa controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A).



Fonte: autoria própria.

Esse resultado vai ao encontro com os resultados obtidos por Dinçer e Kivanç, (2021), onde avaliam a segurança de isolados de *Enterococcus faecium* a partir da atividade hemolítica e da resistência a diferentes antimicrobianos. Os autores não encontraram atividade hemolítica em nenhum dos isolados estudados. Em outro trabalho realizado por Choeisoongnern *et al.* (2021), a bactéria estudada, *E. faecium*, isolada de bebidas fermentadas, apresentou γ -hemólise, indicando que não houve hidrólise dos eritrócitos e garantindo a segurança do isolado. Apesar dos

autores não terem encontrado o mesmo resultado, o isolado também foi considerado seguro e candidato a probiótico.

A atividade hemolítica está associada com fatores de virulência, sendo potencialmente prejudiciais (FUGABAN *et al.*, 2021), e por essa razão é de grande importância a ausência de atividade hemolítica em cepas estudadas como candidatas a probiótico.

4.1.2 Avaliação da atividade de gelatinase

A bactéria *E. faecium* M7AN10 apresentou resultados negativos para a degradação da gelatina. A cepa utilizada como controle, *S. aureus* ATCC 25923, apresentou resultado positivo para hidrólise de gelatina.

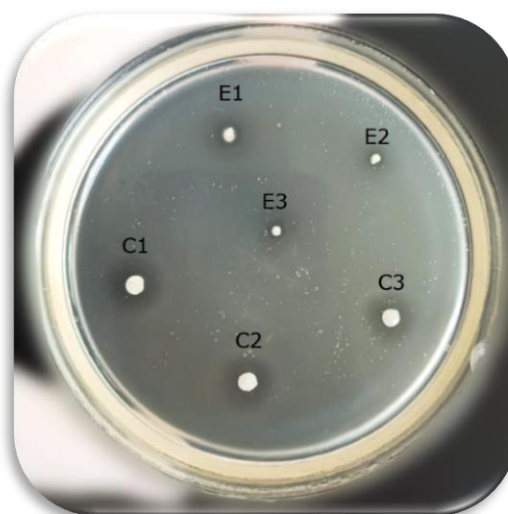
Gelatinase é um fator de virulência em bactérias que hidrolisam a gelatina, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos. A produção de gelatinase também é conhecida como fator de virulência necessário para a invasão de patógenos bacterianos, promovendo infecção sistêmica (BINDU, LAKSHMIDEVI, 2020).

De acordo com Ghattargi *et al.* (2018), o isolado estudado de *E. faecium* não realiza hidrólise de gelatina. Fugaban *et al.* (2021), em seu estudo, onde mencionam que a gelatinase pode degradar colágeno, hemoglobina e outros peptídeos que possuem um papel importante na linha de defesa de animais, também não obtiveram resultados positivos para atividade de gelatinase nos isolados estudados. Outro trabalho, realizado por Tan *et al.* (2013), avaliou-se o *E. faecium* isolado de fermento. Os autores também não observaram nenhum fator de virulência associados ao isolado, não possuindo atividade de gelatinase nos testes realizados.

4.1.3 Avaliação da atividade enzimática

Com relação à atividade enzimática, o *E. faecium* M7AN10 apresentou atividade proteolítica, como pode-se observar nos halos da Figura 3. Este teste foi realizado de forma qualitativa, para avaliar a presença ou não de proteólise.

Figura 3 – Atividade proteolítica presente no isolado *Enterococcus faecium* M7AN10 (E1, E2 e E3) e na cepa controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1, C2 e C3).



Fonte: autoria própria.

Papadimitriou *et al.* (2021) 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 (aumentam a eficiência alimentar) e na redução da alergenicidade das proteínas derivadas do leite.

Semelhantes resultados foram encontrados por Dinçer e Kivanç (2021), onde suas cepas de *E. faecium* também apresentaram atividade proteolítica. A proteólise do leite, segundo Kordesedehi *et al.* (2018), pode reduzir a quantidade de epítomos antigênicos e, por consequência, diminuir a alergenicidade do leite. Nesse mesmo estudo, Kordesedehi *et al.* (2018) obtiveram resultados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

4.1.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é comum entre as bactérias do gênero *Enterococcus*, por sua capacidade de adquirir resistência e transferir genes de resistência horizontalmente (AMACHAWADI *et al.*, 2018). 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 (PAULA, 2019).

Após 24 horas de incubação, o isolado *E. faecium* mostrou-se suscetível a todos os antimicrobianos testados, exceto a Ciprofloxacina, classificando-se como intermediário (Tabela 2).

Estes dados são de grande importância, pois há diversas bactérias do gênero *Enterococcus* que são resistentes a Vancomicina, como mostra Raza *et al.* (2018). A resistência a Ciprofloxacina também é descrita por Kim *et al.* (2018).

Em outro estudo, Amachawadi *et al.* (2018) avaliaram *E. faecium* isolado de probióticos utilizados em animais de produção, identificou-se suscetibilidade à gentamicina, linezolida, nitrofurantoína, estreptomicina e vancomicina, indo ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade de *Enterococcus faecium* M7AN10.

Antimicrobiano	Código	Concentração (µg)	Interpretação	Fonte
Estreptomicina	EST	300	23 mm = S	EUCAST
Eritromicina	ERI	5	30 mm = S	CLSI
Norfloxacina	NOR	10	19 mm = S	CLSI
Linezolida	LNZ	30	28 mm = S	CLSI
Nitrofurantoína	NIT	300	23 mm = S	CLSI
Ampicilina	AMP	10	33 mm = S	CLSI
Ciprofloxacina	CIP	5	18 mm = I	CLSI
Cloranfenicol	CLO	30	29 mm = S	CLSI
Gentamicina	GEN	10	19 mm = S	EUCAST
Tetraciclina	TET	30	33 mm = S	CLSI
Vancomicina	VAN	30	23 mm = S	CLSI

Fonte: autoria própria.

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

4.2.1 Avaliação da capacidade de produção de exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos são macromoléculas extracelulares excretadas que formam uma cápsula ou uma camada gelatinosa ligada ao microrganismo. Bactérias probióticas produtoras de EPS são de grande importância por sua aplicabilidade em atividades como antimicrobiana, imunomoduladora, anti-

inflamatória e antioxidante (ANGELIN, KAVITHA, 2020). Song *et al.* (2021) 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.

Após 48 horas de incubação, observou-se a formação de colônias pretas em grande quantidade, confirmando que o isolado é produtor de EPS. O controle positivo apresentou colônias pretas, enquanto no controle negativo as colônias permaneceram róseas, comprovando a eficácia do meio.

Esse dado vai ao encontro com os achados de Ghattargi *et al.* (2017) e contrário aos resultados observados por Dinçer e Kivanç (2021), ressaltando a variabilidade entre os diferentes isolados de *E. faecium*.

4.2.2 Avaliação da capacidade de auto-agregação

A média da auto-agregação do *E. faecium* M7AN10 obtida foi de 33,50%, sendo t_5 o intervalo mais significativo (50,95%). Conforme o trabalho de (BRANDALIZE, 2013), a auto-agregação está relacionada com a capacidade de adesão no epitélio intestinal, sendo assim uma boa forma de 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 (FUGABAN *et al.*, 2021).

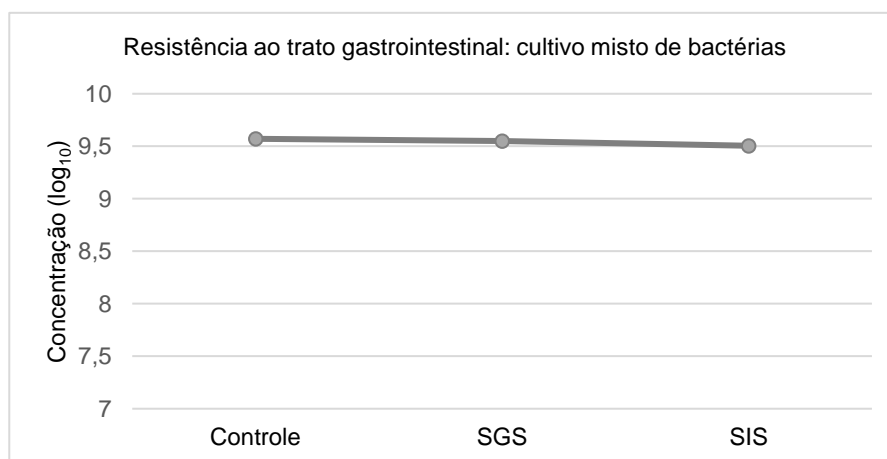
Este dado é superior ao encontrado por Brandalize (2013), onde o isolado *E. faecium* apresentou uma auto-agregação de 10,96%. Entretanto, Fugaban *et al.* (2021) encontrou altos níveis de auto-agregação para o *E. faecium* estudado, acima de 50%. Em outro trabalho, Zommiti *et al.* (2018), que estudou *E. faecium* isolado de carne seca tunisina, também encontrou altos níveis de auto-agregação, variando entre 50% e 96%. Esses dados, apesar de indicarem que há isolados com melhores níveis de auto-agregação, não excluem o potencial do *E. faecium* M7AN10 como probiótico, visto que os resultados encontrados confirmam a capacidade deste isolado de adesão ao epitélio intestinal.

4.2.3 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.* (2020), contudo neste trabalho foi utilizado um protocolo simulando o TGI em forma de fluxo contínuo. Ao invés de expor separadamente o isolado aos diferentes estresses, a mesma amostra contendo um cultivo misto das 3 bactérias foi exposta às alterações de pH, aos sais biliares, e às enzimas digestivas, por períodos de tempo 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 9,6 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, como mostra o gráfico representado na Figura 4. Os valores médios após o SGS se mantiveram em aproximadamente 9,55 log UFC/mL e após o SIS em aproximadamente 9,50 log UFC/mL.

Figura 4 – Concentração de bactérias viáveis após a exposição ao trato gastrointestinal em fluxo contínuo.



Fonte: autoria própria.

O cultivo misto apresentou-se com concentração constante, indo contra o encontrado por Amaral *et al.* (2017), onde o isolado estudado se manteve constante apenas após a exposição às condições gástricas. Succi *et al.* (2005) 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 (SORNSENEE *et al.*, 2021).

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

Após o período de 24 horas de incubação, não foi observado halos de inibição nas placas contendo crescimento das bactérias indicadoras (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Já o controle utilizado, a *C. fimi* NCTC 7547, foram observados halos de inibição medindo 5 mm em média.

Esse resultado vai contra o encontrado por HUANG *et al.* (2016), onde foi observado um significativo decréscimo no crescimento de *Listeria monocytogenes*. Apesar disso, KURTZ *et al.* (2020), encontraram resultados semelhantes, estudando *E. faecium* M7AN10, mesmo utilizando um protocolo diferente, que é o de difusão em ágar com discos.

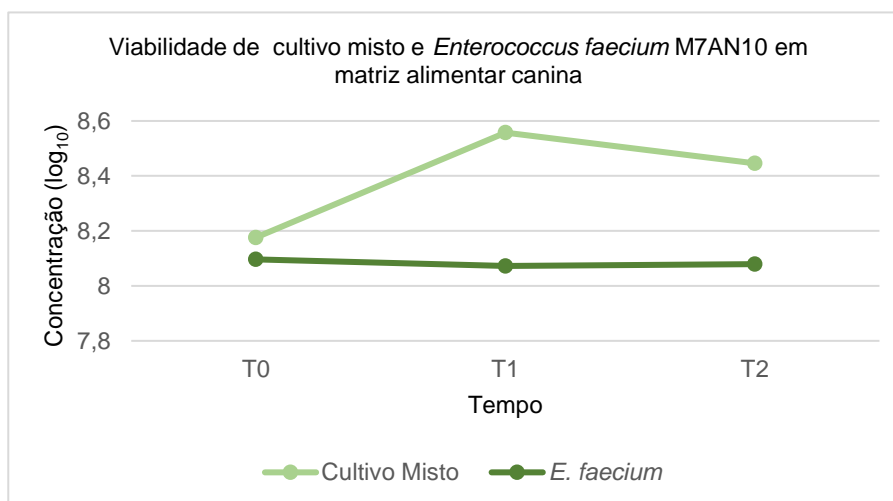
Outro estudo demonstrou atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, contudo, para obter esses resultados, foi necessário isolar a enterocina 12a do isolado *E. faecium* estudado (SHARMA *et al.*, 2021). Com isso, é possível ainda avaliar a atividade antimicrobiana do *E. faecium* M7AN10 utilizando diferentes protocolos.

4.4 Viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar

As contagens das bactérias iniciaram a partir de dois inóculos contendo 8,2 logs UFC/mL (cerca de 10^9 UFC/mL), um para cada teste, sendo um deles contendo apenas o *E. faecium* M7AN10 e outro contendo o cultivo misto (*E. faecium* M7AN10, *L. rhamnosus* LB 1.5 e *L. paracasei* LB 6.4). Houve um decréscimo nas contagens de ambas as rações tratadas, porém as concentrações não se mantiveram abaixo de 8 log UFC/mL (10^8 UFC/mL) em nenhum dos dias, conforme mostra o gráfico ilustrado na Figura 5. As médias e desvios, descritas em log UFC/mL, em t_0 foram equivalentes a 8,17 (cultivo misto) e $8,09 \pm 0,06$ (*E. faecium* M7AN10); em t_1 $8,55 \pm 0,08$ (cultivo misto) e $8,07 \pm 0,02$ (*E. faecium* M7AN10); e

em t_2 $8,44 \pm 0,10$ (cultivo misto) e $8,07 \pm 0,10$ (*E. faecium* M7AN10). As contagens foram realizadas em placa contendo PCA, e as microdiluições foram avaliadas conforme demonstra a Figura 6.

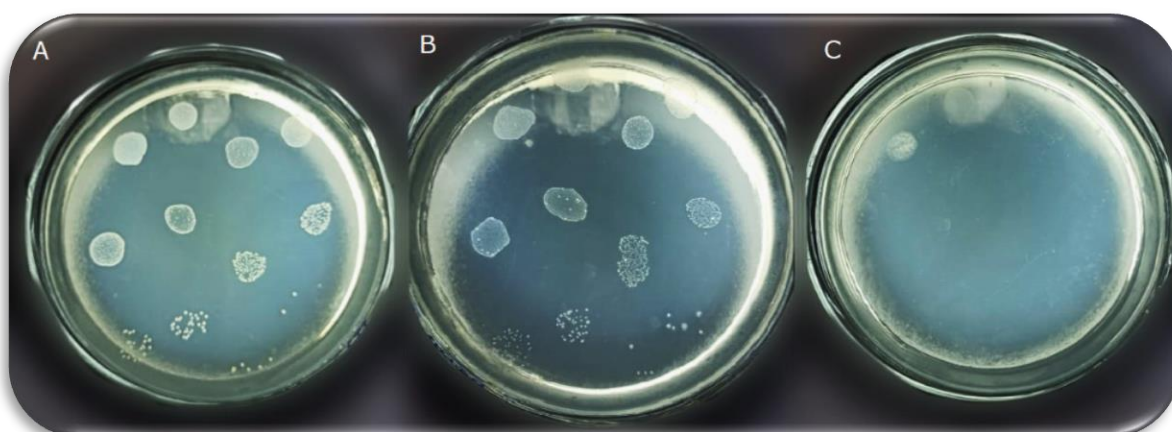
Figura 5 – Estabilidade das bactérias lácticas em matriz alimentar canina.



Fonte: autoria própria.

Apesar de ter sido observado contagens de BALs 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, então os resultados observados se mostram promissores para novas pesquisas serem realizadas.

Figura 6 – Microdiluições de 10^{-1} a 10^{-6} : alimento contendo *Enterococcus faecium* M7AN10 (A), cultivo misto (B) e grupo controle (C).



Fonte: autoria própria.

5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos exigem aprofundamento do estudo, podendo-se avaliar a co-agregação de *E. faecium* em conjunto com bactérias patogênicas de origem clínica, além de avaliar a atividade antimicrobiana frente a estas bactérias. Também, pode-se avaliar a viabilidade das bactérias ácido-lácticas selecionadas em matriz alimentar por um período maior. Apesar disso, os resultados obtidos foram positivos para confirmar a utilização do *E. faecium* M7AN10 como probiótico para cães.

Dentro deste cenário, encontrar novas fontes de bactérias probióticas também se torna necessário. A partir dos testes realizados e dos estudos levantados, o isolado *E. faecium* M7AN10 se mostrou de grande valia no que se refere a aditivos probióticos para cães. A bactéria se mostrou inócua, não patogênica, com boa capacidade de resistir ao trato gastrointestinal, sensível a uma variada gama de antimicrobianos, produtora de EPS e se manteve viável ao ser inoculada em matriz alimentar canina.

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, para que se obtenha os efeitos desejados, para que não utilizemos mais os limites determinados pela ANVISA, que se referem apenas a humanos. 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.

6 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, I. C. *et al.* Starch characterization of commercial extruded dry pet foods. **Translational Animal Science**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 1017-1022, 14 Feb. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/tas/txaa018>.

AMACHAWADI, R. G. *et al.* Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* strains isolated from commercial probiotic products used in cattle and swine^{1,2}. **Journal Of Animal Science**, [S.l.], v. 96, n. 3, p. 912-920, Mar. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jas/sky056>.

AMARAL, D. M. F. *et al.* *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. **Journal Of Dairy Science**, [S.l.], v. 100, n. 2, p. 933-949, Feb. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11513>.

ANGELIN, J. *et al.* Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 162, p. 853-865, Nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>.

ANVISA. **Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos**. [S.l.], n. 21, Maio 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/448269>. Acesso em: 10 Set. 2022.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707.

BINDU, A. *et al.* Identification and in vitro evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. **Archives Of Microbiology**,

[S.I.], v. 203, n. 2, p. 579-595, 29 Sep. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-02037-0>.

BRANDALIZE, C. C. **Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. **Instrução Normativa nº13, de 30 de Novembro de 2004**. [S.I.] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sarc-mapa-no-13-de-30-11-2004.pdf/view>. Acesso em: 10 Set. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 44, de 15 de Dezembro de 2015**. [Altera a IN nº13, de 30 de Nov. de 2004]. [S.I.] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-ndeg-44-de-15-12-2015.pdf/view>. Acesso em: 10 Set. 2022.

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**. [S.I.] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/registro-cadastro>. Acesso em: 15 Set 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 28, de 26 de Julho de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº144, Seção 1, p. 141-154, 27 Jul. 2018.

BREYER, G. M. *et al.* Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a screening for novel probiotic candidates and their transcriptional response to acid stress. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.I.], v. 13, n. 2, p. 468-483, 23 Aug. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-020-09700-4>.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, [S.I.], v. 44, n. 1, p. 1-8, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>.

CHOEISOONGNERN, T. *et al.* Potential Probiotic *Enterococcus faecium* OV3-6 and Its Bioactive Peptide as Alternative Bio-Preservation. **Foods**, [S.I.], v. 10, n. 10, p. 2264, 24 Sep. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10102264>.

DİNÇER, E.; KIVANÇ, M. In vitro evaluation of probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish pastırma. **Archives Of Microbiology**, [S.I.], v. 203, n. 6, p. 2831-2841, 20 Mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02273-y>.

FREEMAN, D. J. *et al.* New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.I.], v. 42, n. 8, p. 872-874, 1 Aug. 1989. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.

FUGABAN, J. I. I. *et al.* Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci. **Current Research In Microbial Sciences**, [S.I.], v. 2, n. 100070, p. 1-13, Dec. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100070>.

GOMES, A. M. P. *et al.* *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends In Food Science & Technology**, [S.I.], v. 10, n. 4-5, p. 139-157, Apr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(99\)00033-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(99)00033-3).

GÓMEZ-GALLEGO, C. *et al.* A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: a double-blind placebo-controlled efficacy study. **Veterinary Microbiology**, [S.I.], v. 197, p. 122-128, Dec. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.015>.

GUARD, B. C. *et al.* Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea. **Plos One**, [S.I.], v. 10, n. 5, p. 1-24, 22 maio 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127259>.

HUANG, Y. *et al.* The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, [S.I.], v. 67, p. 18-24, Sep. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.009>.

KIM, Y. B. *et al.* Characteristics of High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Retail Chicken Meat in Korea. **Journal Of Food Protection**, [S.I.], v. 81, n. 8, p. 1357-1363, 17 Jul. 2018. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-046>.

KORDESEDEHI, R. *et al.* Modification of IgE binding to α S1-casein by proteolytic activity of *Enterococcus faecium* isolated from Iranian camel milk samples. **Journal Of Biotechnology**, [S.I.], v. 276-277, p. 10-14, Jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.005>.

KURTZ, J. P. *et al.* The Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Buffalo Milk: Food Matrix Studies. **Journal of Clinical Nutrition and Food Science**. Hyderabad, v. 4, n. 1, p. 17-29, 2021.

LOPES, S. P. **Desenvolvimento e Caracterização de Cápsulas Probióticas Contendo *Lactobacillus Rhamnosus***. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

LUCENA, R. *et al.* Effect of probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on liver function in healthy dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.I.], v. 33, n. 6, p. 2628-2634, 2 Oct. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.15625>.

MARRA, Andrea *et al.* Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 59-65, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.024>.

MILES, A. A. *et al.* The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology And Infection*, [S.I.], v. 38, n. 6, p. 732-749, Nov. 1938. Cambridge University Press. <http://dx.doi.org/10.1017/s002217240001158x>.

MORENO, M. R. F. *et al.* Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.I.], v. 94, n. 2, p. 214-229, Feb. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01823.x>.

MOTTA, A.s.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 92, n. 1, p. 63-70, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01490.x>.

OLIVEIRA, C. P. **Ações de Bactérias Lácticas de Duas Marcas Comerciais de Leites Fermentados sobre o Ganho de Peso e Parâmetros Hematológicos e Histopatológicos de Ratos *Wistar* Fazendo uso de Indometacina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

PAPADIMITRIOU, K. *et al.* Whole-genome sequence data of the proteolytic and bacteriocin producing strain *Enterococcus faecalis* PK23 isolated from the traditional Halitzia cheese produced in Cyprus. **Data In Brief**, [S.I.], v. 38, p. 107437, Oct. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2021.107437>.

PAULA, P. L. M. **Caracterização Tecnológica de *Enterococcus faecium* Isolados de Queijos Artesanais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

RAZA, T.; ULLAH, S. R.; MEHMOOD, K. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **Journal of the Pakistan Medical Association**, [S.l.], v. 68, n. 5, p. 768-772, May 2018.

RE, B. del; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 438-442, dez. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>.

REIS, J.S. *et al.* Amido resistente, um potencial ingrediente para ser considerado em alimentos funcionais para cães. **Archivos de Zootecnia**, [S.l.], v. 66, n. 256, p. 639-648, 15 Oct. 2017. Cordoba University Press (UCOPress). <http://dx.doi.org/10.21071/az.v66i256.2783>.

RODRIGUES, B. M. **Inclusão de Bactérias Probióticas em Ração para Gatos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

ROSE, L. *et al.* Efficacy of a Probiotic-Prebiotic Supplement on Incidence of Diarrhea in a Dog Shelter: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.l.], v. 31, n. 2, p. 377-382, 10 Feb. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.14666>.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1-16, Mar. 2006.

SHARMA, P. *et al.* Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. **Bmc Microbiology**, [S.l.], v. 21, n. 39, 4 Feb. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-021-02086-5>.

SONG, Y. R. *et al.* Evaluation of Probiotic Properties of *Pediococcus acidilactici* M76 Producing Functional Exopolysaccharides and Its Lactic Acid Fermentation of Black Raspberry Extract. **Microorganisms**, [S.I.], v. 9, n. 7, p. 1364, 23 Jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9071364>.

SORNSENEE, P. *et al.* Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented Palm Sap in Thailand. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.I.], v. 13, n. 4, p. 957-969, 17 Feb. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-021-09754-y>.

TAN, Q. *et al.* Safety Assessment and Probiotic Evaluation of *Enterococcus Faecium* YF5 Isolated from Sourdough. **Journal Of Food Science**, [S.I.], v. 78, n. 4, p. 587-593, 12 Mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12079>.

TSIGKRIMANI, M. *et al.* Microbial Ecology of Sheep Milk, Artisanal Feta, and Kefalograviera Cheeses. Part II: technological, safety, and probiotic attributes of lactic acid bacteria isolates. **Foods**, [S.I.], v. 11, n. 3, p. 459-478, 3 Feb. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11030459>.

WERNIMONT, S. M. *et al.* The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: impact on health and disease. **Frontiers In Microbiology**, [S.I.], v. 11, n. 1266, p. 1-49, 25 Jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>.

WHITE, R. *et al.* Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, [S.I.], v. 8, n. 5, p. 451-466, 5 Jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2017.1334754>.

WIEËRS, G. *et al.* How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.I.], v. 9, p. 1-17, 15 Jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 1 Apr. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

ZOMMITI, M. *et al.* Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated From Artisanal Tunisian Meat “Dried Ossban”. **Frontiers In Microbiology**, [S.l.], v. 9, n. 1685, 6 Aug. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01685>.