

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Alessandra Alexandrino Diniz

**PROSPECÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS COM POTENCIAL
PROBIÓTICO PARA USO EM FORMULAÇÕES PARA GATOS DOMÉSTICOS**

Belo Horizonte

2025

Alessandra Alexandrino Diniz

**PROSPECÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS COM POTENCIAL
PROBIÓTICO PARA USO EM FORMULAÇÕES PARA GATOS DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre (a) em Microbiologia.

Orientadora: Professora Elisabeth Neumann

Coorientador: Sávio Henrique de Cicco Sandes

Belo Horizonte

2025

043

Diniz, Alessandra Alexandrino.

Prospecção de linhagens bacterianas com potencial probiótico para uso em formulações para gatos domésticos [manuscrito] / Alessandra Alexandrino Diniz. – 2025.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Professora Elisabeth Neumann. Coorientador: Sávio Henrique de Cicco Sandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Gatos. 3. Disbiose. 4. Probióticos. I. Neumann, Elisabeth. II. Sandes, Sávio Henrique de Cicco. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ALESSANDRA ALEXANDRINO DINIZ**

Nº REGISTRO: 2023665781

Às **14:00** horas do dia **11 de abril de 2025**, reuniu-se, presencialmente no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Fernanda Vieira Amorim da Costa (Veterinária - Departamento de Clínica e Cirurgia / UFMG), Bruna Maria Salotti de Souza (Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA/UFMG), Profa. Dra. Elisabeth Neumann (Orientadora) e o Dr. Sávio Henrique de Cicco Sandes (Coorientador), para julgar o trabalho final **"Prospecção de linhagens bacterianas com potencial probiótico para uso em formulações para gatos domésticos"** da aluna **Alessandra Alexandrino Diniz**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Elisabeth Neumann - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 11 de abril de 2025

Membros da banca:

Profa. Dra. Fernanda Vieira Amorim da Costa

Profa. Dra. Bruna Maria Salotti de Souza

De acordo:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann

(Orientadora)

Dr. Sávio Henrique de Cicco Sandes

(Coorientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 07/05/2025, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 07/05/2025, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Maria Salotti de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 07/05/2025, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sávio Henrique de Cicco Sandes, Usuário Externo**, em 09/05/2025, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4025683 e o código CRC 1AD56006.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família pelo carinho e apoio nessa longa jornada, sem vocês nada seria possível.

À minha orientadora, professora Elisabeth Neumann pela oportunidade, ensinamentos, confiança e todo apoio.

Ao meu coorientador Sávio Henrique de Cicco Sandes que me acompanhou nesse caminho, obrigado pela amizade e paciência.

A todos amigos de laboratório que compartilharam experiências e bons momentos.

A todos o Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade.

Obrigado a todos!

RESUMO

Cães e gatos tornaram-se uma parte essencial na vida humana, aumentando o interesse pelo cuidado com a saúde e bem-estar dos pets. O uso de probióticos seria uma alternativa para manutenção da microbiota e auxiliar em quadros de disbiose. Apesar da expansão do mercado de probiótico para *pets*, há poucos estudos investigando o uso de probióticos em gatos, sendo necessário isolar e caracterizar linhagens bacterianas com potencial probiótico que possam trazer impacto na saúde e bem-estar desses felinos. Bactérias do ácido láctico foram isoladas de fezes e saliva de 3 gatos recém-desmamados e suas características probióticas foram investigadas. Foram identificadas 26 bactérias entre as espécies *Limosilactobacillus reuteri* (70,59%), *Limosilactobacillus mucosae* (2,94%), *Lactiplantibacillus plantarum* (2,94%), e 8 isolados entre *Enterococcus* spp. (11,76%) e *Staphylococcus* spp. (11,76%). Os isolados foram submetidos a ensaios para avaliar as características funcionais (resistência ao suco gástrico artificial e sais biliares), benéficas (hidrofobicidade da superfície celular, produção de exopolissacarídeos, auto-agregação, co-agregação e antagonismo com patógenos) e de segurança (produção de gelatinase e hemólise, susceptibilidade a antimicrobianos). Vinte e nove isolados resistiram ao suco gástrico, sendo 23 tolerantes ou sensíveis a sais biliares. A baixa hidrofobicidade celular foi observada em 32 isolados, e nenhum produziu exopolissacarídeos. Auto-agregação média (33% - 66%) foi observada em nove, e dois mostraram alta co-agregação (>66%) com *P. aeruginosa*. Entretanto, 22 isolados demonstram atividade antagonista contra *S. Typhimurium*. Dez isolados foram selecionados para caracterização de segurança, todos os quais não apresentaram produção de gelatinase ou hemólise, e foram sensíveis a pelo menos 6 dos 10 antibióticos testados. Dentre esses, três linhagens foram selecionadas para avaliação *in vivo* em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*. Duas linhagens demonstraram alguma resistência com percentual de sobrevivência de 18,18% e 8,33%, indicando que embora promissoras os isolados necessitam mais estudos para aprimorar a eficácia.

Palavras-chave: probiótico; gato; bactérias do ácido láctico; patógenos; disbiose.

ABSTRACT

Dogs and cats have become integral to human life, driving increased attention to their health and well-being. Among emerging strategies to support pet health, probiotics represent a promising alternative for maintaining intestinal microbiota balance and managing dysbiosis. Research on probiotic use in cats remains limited, need to isolate and characterize bacterial strains with potential benefits for feline health. Lactic acid bacteria were isolated from the feces and saliva of three kittens and evaluated for their probiotic potential. 26 isolates were identified, comprising *Limosilactobacillus reuteri* (70.59%), *Limosilactobacillus mucosae* (2.94%), and *Lactiplantibacillus plantarum* (2.94%), in addition to eight isolates of *Enterococcus* spp. (11.76%) and *Staphylococcus* spp. (11.76%). The isolates were tested for functional (resistance to artificial gastric juice and bile salts), beneficial (cell surface hydrophobicity, exopolysaccharide production, auto-aggregation, co-aggregation, and pathogen antagonism), and safety (gelatinase and hemolysis production, antimicrobial susceptibility) characteristics. Twenty-nine isolates demonstrated resistance to gastric juice and 23 were tolerance or sensitivity to bile salts. Low cell surface hydrophobicity was noted in 32 isolates, and none produced exopolysaccharides. Moderate auto-aggregation (33%–66%) was observed in nine isolates, and two demonstrated high co-aggregation (>66%) with *Pseudomonas aeruginosa*. However, 22 isolates showed antagonistic activity against *Salmonella Typhimurium*. Ten isolates were selected for safety characterization, all don't have gelatinase and hemolytic activity, and were sensitive to at least six of ten antibiotics tested. From these, three strains were chosen for in vivo evaluation in a murine model of *S. Typhimurium* infection. Two strains obtained protective effects, with survival rates of 18.18% and 8.33%, these indicate probiotic potential, but further studies are necessary to enhance the efficacy of these strains.

Keywords: probiotic; cat; lactic acid bacteria; pathogens; dysbiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico de diversidade das espécies isoladas em felinos.....	30
Figura 2: Curva de crescimento do isolado 6A1, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , resistente a sais biliares.....	33
Figura 3: Curva de crescimento do isolado A6D2, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , tolerante a sais biliares.....	33
Figura 4: Curva de crescimento do isolado A7H2, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , sensível a sais biliares.....	34
Figura 5: Crescimento do isolado A6C, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , nos meios com substituição da glicose.....	35
Figura 6: Crescimento do isolado 6G, <i>Staphylococcus hominis</i> , nos meios com substituição da glicose.....	37
Figura 7: Produção de gelatinase.....	42
Figura 8: Produção de hemólise.....	43
Figura 9: Percentual de ganho de peso anterior ao desafio com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	44
Figura 10: Sobrevivência após desafio com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação bacteriana dos isolados felinos.....	29
Tabela 2: Percentual de inibição frente ao desafio de suco gástrico.....	31
Tabela 3: Percentual de inibição e classificação dos isolados quanto à tolerância a sais biliares.....	32
Tabela 4: Teste de adesão dos microrganismos a solventes.....	34
Tabela 5: Crescimento dos isolados nos meios modificados.....	36
Tabela 6: Potencial de auto-agregação dos isolados.....	37
Tabela 7: Potencial de co-agregação com patógenos.....	38
Tabela 8: Atividade antagonista contra patógenos.....	39
Tabela 9: Síntese dos resultados de caracterização dos probiótica dos isolados selecionados para caracterização de segurança.....	41
Tabela 10: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados.....	43

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

μ – Micro

BAL – Bactérias do Ácido Lático

BHI – *Brain Heart Infusion* / Infusão de Cérebro e Coração

DO – Densidade Óptica

EFSA – Autoridade Europeia para Segurança Alimentar

EPS – Exopolissacarídeos

g – Grama

L – Litro

m – Mili

MATS – *Microbial Adhesion to Solvents* / Adesão Microbiana a Solventes

mm – milímetro

MRS – De Man, Rogosa e Sharpe

nm – Nanômetro

pH – Potencial de Hidrogeniônico

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

QPS – Presunção Qualificada de Segurança

rpm – Rotações por minuto

ST – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium

UFC – Unidade Formadora de Colônia

v – Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Felinos como animais de estimação.....	14
1.2 Microbiota intestinal de felinos.....	15
1.2.1 Disbiose em felinos.....	16
1.3 Probióticos.....	17
2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Isolamento, identificação, manutenção e cultivo de bactérias.....	22
3.2 Sensibilidade a suco gástrico artificial.....	22
3.3 Sensibilidade à sais biliares.....	23
3.4 Hidrofobicidade da superfície celular.....	23
3.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeos.....	24
3.6 Potencial de auto-agregação.....	24
3.7 Potencial de co-agregação com patógenos.....	24
3.8 Teste de antagonismo in vitro contra bactérias patogênicas.....	25
3.9 Avaliação da capacidade hemolítica.....	26
3.10 Avaliação da produção de gelatinase.....	26
3.11 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	26
3.12 Avaliação do potencial probiótico <i>in vivo</i> – modelo murino de infecção por <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> sorovar. Typhimurium.....	27
3.13 Análises estatísticas.....	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Isolamento, caracterização morfofisiológica e identificação dos isolados.....	29
4.2 Caracterização probiótica <i>in vitro</i>	30
4.2.1 Resistência a suco gástrico.....	30
4.2.2 Resistência a sais biliares.....	32
4.2.3 Hidrofobicidade da superfície celular.....	34
4.2.4 Produção de Exopolissacarídeos.....	35
4.2.5 Potencial de auto-agregação e co-agregação com patógenos.....	37
4.2.6 Antagonismo a bactérias patogênicas.....	39
4.3 Características de segurança.....	42
4.3.1 Produção de gelatinase e hemólise.....	42

4.3.2	Susceptibilidade a antimicrobianos.....	43
4.4	Teste <i>in vivo</i> potencial probiótico.....	44
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICES.....	59
	Apêndice A – Curvas de crescimento dos isolados na presença e ausência de suco gástrico artificial.....	59
	Apêndice B – Curva de crescimento dos isolados na presença e ausência de sais biliares.....	67
	Apêndice C – Atividade antagônica dos isolados bacterianos de felinos contra patógenos Gram positivo.....	76
	Apêndice D – Síntese dos resultados de caracterização dos probiótica dos isolados felinos.....	77
	Apêndice E – Diâmetro dos halos observados no antibiograma.....	79
	ANEXOS.....	80
	Anexo A - Consentimento livre e esclarecido dos tutores.....	80
	Anexo B - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Felinos como animais de estimação

O número de cães e gatos como animais de companhia vem crescendo, tornando-se uma parte estável na vida dos seres humanos (YANG & WU, 2023). De acordo com Zha, Zhu e Che (2024), globalmente, as famílias possuem 471 milhões de cães e 373 milhões de gatos de estimação. Somente nos Estados Unidos, uma a cada duas famílias, e na China, uma em cada quatro famílias possuem um cachorro ou um gato como animal de companhia (ZHA; ZHU; CHE, 2024). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, a população de cães e gatos chega a 52,2 e 22,1 milhões, respectivamente (DEFELIPE; SAVALLI; OTTA, 2020). Em locais como os Estados Unidos e a Europa, a população de gatos já supera a de cães como animais domésticos, e o Brasil também apresenta essa tendência, com um maior crescimento da população felina (FELIPETTO et al, 2022).

Dentro deste cenário de aumento da população de animais de estimação, a interação com os animais de companhia tem sido relacionada a benefícios a saúde física e mental dos tutores (SCORESBY et al., 2021; LEE et al., 2022; YANG & WU, 2023). Segundo Defelipe, Savalli e Otta (2020), os donos de animais de estimação apresentam uma responsabilidade em relação aos animais, o que influencia na organização do cotidiano. As rotinas de cuidados diários para manter os animais de estimação motivam a prática de atividades físicas, como caminhadas diárias, cuidados de higiene e banho, e visitas ao veterinário. Além disso, a posse de animais de estimação também se relaciona com níveis mais baixos de depressão (DEFELIPE; SAVALLI; OTTA, 2020).

A humanização dos animais de estimação é um fenômeno que reconhece os animais como membros da família e os trata como indivíduos com emoções (LEE et al., 2022). Um exemplo dessa humanização são animais de estimação realizando atividades humanas, como festas de aniversários para cães e gatos e dormir com os donos na cama (DEFELIPE; SAVALLI; OTTA, 2020). Os animais de companhia tornaram-se uma parte valiosa da vida dos seres humanos, com isso, nos últimos anos, tem aumentando o interesse na saúde e bem estar dos pets (LEE et al., 2022). Melhorias dos serviços veterinários, a redução da mortalidade e morbidade dos animais, e o aprimoramento na prevenção e combate a doenças desempenham um papel importante no aumento da qualidade de vida dos animais de estimação (RUDENKO et al., 2021). Entretanto, a proximidade dos pets com seus tutores possibilita condições

favoráveis para a transmissão de diversos patógenos, sendo fator de risco para zoonoses (FELIPETTO et al, 2022).

1.2 Microbiota intestinal de felinos

Os gatos evoluíram como animais carnívoros, com dietas ricas em proteínas e um trato gastrointestinal relativamente simples, mas que desempenha um papel importante na saúde desses animais, sendo necessário uma dieta rica em proteínas para suprir suas necessidades nutricionais (LEE et al, 2022). Contudo, ainda há poucos estudos sobre a microbiota do trato gastrointestinal de felinos (YANG & WU, 2023). Como os seres humanos, os animais domésticos possuem uma microbiota complexa, constituída principalmente de bactérias anaeróbias estritas ou facultativas (SUCHODOLSKI, 2022).

Em animais saudáveis, fatores como o sexo do animal e a idade podem influenciar a microbiota (LYU et al., 2020). O envelhecimento em animais também tem sido associado a diversas mudanças intestinais e, de alguma forma, relacionado à saúde desses animais (LEE et al., 2022). A composição da dieta também tem sido relacionada com alterações na população microbiana e no metabolismo do intestino de humanos e animais (LYU et al., 2020; SUCHODOLSKI, 2022) Outros fatores, como doenças e medicamentos, como antibióticos e quimioterápicos também podem influenciar a composição da microbiota intestinal (SUCHODOLSKI, 2022). O microbioma presente no trato gastrointestinal, atua em diferentes vias, afetando tanto a absorção quanto o metabolismo de diferentes nutrientes e na proteção do hospedeiro (LEE et al., 2022).

Em animais saudáveis, a diversidade e a carga microbiana aumentam ao longo do trato gastrointestinal (LYU et al., 2020). O número de bactérias presentes no estômago, intestino delgado, colón e fezes em cães e gatos é de maneira geral $10^4 - 10^5$ UFC/g, $10^5 - 10^9$ UFC/g, $10^9 - 10^{11}$ UFC/g e $10^8 - 10^{11}$ UFC/g, respectivamente (YANG & WU, 2023). Os filos que predominam na microbiota intestinal de cães e gatos são Firmicutes, Fusobacteria e Bacteroidetes, os quais, quando presentes em equilíbrio pode exercer influência positiva na saúde do hospedeiro, modulando o sistema imune, defendendo contra patógenos intestinais e provendo vitaminas e nutrientes (SUCHODOLSKI, 2022).

O trato gastrointestinal dos felinos possui uma grande variabilidade de microrganismos (LEE et al., 2022). Estudos mostram que espécies de *Bacteroides* ssp., *Clostridium* ssp.,

Enterococcus ssp., *Streptococcus* ssp., *Fusobacteria* ssp. e *Eubacteria* ssp. estão presentes no intestino dos felinos (LEE et al., 2022; LYU et al., 2020;). O trato gastrointestinal de gatos inclui, como representantes de bactérias do ácido lático (BAL) *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* e *L. sakei*, que são bactérias lácticas comumente encontradas no intestino de animais, incluindo humanos, embora a quantidade varie de indivíduo para indivíduo (LEE et al., 2022).

As bactérias possuem contato direto com as células epiteliais intestinais por estarem presente no lúmen intestinal ou aderidas à superfície da mucosa ou nas criptas intestinais (ZIESE & SUCHODOLSKI, 2021). Além das bactérias, os mamíferos abrigam no intestino outros microrganismos, como fungos, vírus e protistas; entretanto, a relação entre eles não está clara (SUCHODOLSKI, 2022; YANG & WU, 2023). Uma microbiota equilibrada e estável é fundamental para manter a saúde intestinal, produzindo metabólitos que podem ter um efeito positivo na saúde do hospedeiro, além de contribuir para a produção de energia pela degradação de nutrientes (YANG & WU, 2023; ZHA; ZHU; CHEN, 2024). Entre esses metabólitos está a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por bactérias fermentadoras de carboidratos, principalmente butirato e propionato, que são utilizados como substrato energético pelas células epiteliais intestinais, contribuem para a integridade da barreira epitelial e possuem efeitos anti-inflamatórios (YANG & WU, 2023). A microbiota também pode promover resistência à colonização por potenciais patógenos, através da exclusão competitiva, e contribuir para a modulação da resposta imune inata e adaptativa (LYU et al., 2020; PLAZA-DIAZ, 2019; ZHA; ZHU; CHEN, 2024).

1.2.1 Disbiose em felinos

Várias doenças têm sido relacionadas com a desregulação da microbiota intestinal, como a doença inflamatória do intestino, que, em gatos, se apresenta juntamente com uma quantidade alterada dos grupos de microrganismos intestinais (LYU et al., 2020; YANG & WU, 2023). Sabe-se que a microbiota gastrointestinal desempenha um papel importante nas doenças que afetam o intestino; entretanto, as relações entre microbiota e doenças intestinais não estão bem esclarecidas (LYU et al., 2020). Estudar e caracterizar a microbiota intestinal de cães e gatos, identificar e entender os biomarcadores da microbiota associados a doenças do trato gastrointestinal é fundamental para entender a relação hospedeiro-microbiota e o

desenvolvimento de produtos para auxiliar na saúde dos animais domésticos (YANG & WU, 2023).

Assim como em seres humanos, o desequilíbrio da microbiota em felinos pode levar a distúrbios gastrointestinais causados pela proliferação de enteropatógenos, bem como pelos processos metabólicos nos quais esses microrganismos participam (LYU et al., 2020). Essa perturbação da microbiota normal, que interrompe a relação de equilíbrio microbiota-hospedeiro, e pode levar ao início de doenças, é definida como disbiose (LEE et al., 2022; LYU et al., 2020). Um exemplo é a redução de *Bifidobacterium* e aumento de *Escherichia coli* relatados em gatos com doença inflamatória intestinal (YANG & WU, 2023). Conforme observado por Zha, Zhu e Chen (2024), os antibióticos são comumente utilizados para tratar doenças nos animais de estimação, principalmente as do trato gastrointestinal. O uso frequente de antibióticos e a dosagem excessiva pode levar a resistência bacteriana ao antibiótico e perturbar o equilíbrio da microbiota intestinal, deixando os animais propensos a diarreia, constipação e outras doenças do trato gastrointestinal (ZHA; ZHU; CHEN, 2024).

Outros agentes além dos antibióticos podem auxiliar na prevenção e no tratamento de doenças em animais de estimação, sendo os probióticos a alternativa preferida para auxiliar no tratamento de problemas de saúde em felinos (LEE et al., 2022; ZHA; ZHU; CHEN, 2024).

1.3 Probióticos

Define-se como probiótico um microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro, devendo ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e proliferar no intestino; ou seja, eles devem ser resistentes ao suco gástrico e capazes de crescer na presença de bile no intestino (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014).

A ANVISA (2021) destaca que a avaliação do uso de probióticos inclui três fatores essenciais: comprovação da identidade da linhagem, segurança e efeito benéfico do microrganismo. Juntamente com a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA), a ANVISA também recomenda a presunção qualificada de segurança (QPS) para microrganismos empregados na produção de alimentos e ração (ANVISA, 2021; LEE et al., 2022). O conhecimento prévio do microrganismo, como histórico de uso, aplicação industrial, reportes clínicos e banco de dados público, pode ser considerado como importante evidência para avaliar o uso seguro de algumas espécies microbiológicas (ANVISA, 2021; LEE et al.,

2022). As diretrizes do QPS também estipulam que microrganismos que produtores de toxinas ou com fatores de virulência não poderem ser utilizados como probióticos. E deve ser assegurado que não existam genes adquiridos de resistência microbiana a antibióticos (LEE et al., 2022). A lista do QPS inclui unidades taxonômicas para bactérias, leveduras e vírus dos quais *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são representativos devido a um extenso registro de uso seguro (LEE et al., 2022).

Lee et al (2022) observaram que os probióticos relacionados ao intestino, produzidos para cães e gatos, vêm ganhando popularidade entre os tutores no tratamento de doenças em felinos, sendo cada vez mais comercializados devido aos benefícios que podem trazer aos animais de companhia. O uso de probióticos demonstram prevenir e favorecer a recuperação de distúrbios digestivos, podendo ser também interessantes como auxiliares no tratamento de distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes tipo 2 (PLAZA-DIAS et al., 2019).

Os probióticos fornecem benefícios ao hospedeiro ao modificar a microbiota gastrointestinal (LEE et al., 2022), bem como ao inibir a colonização por patógenos através da resistência à colonização e produção de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas e os ácidos orgânicos (YANG & WU, 2023). Os probióticos também auxiliam na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal que é essencial para a homeostase intestinal, por ser a primeira barreira contra o ambiente externo, estimulando a produção de mucinas e proteínas de junção estreita, direta ou indiretamente (PLAZA-DIAS et al., 2019; YANG & WU, 2023). Podem influenciar as funções imunológicas, promovendo a diferenciação das células T, controlando os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e estimulando a produção de sIgA – Imunoglobulina A secretória (PLAZA-DIAS et al., 2019).

Vale ressaltar que o mecanismo de ação dos probióticos é heterogêneo e específico da linhagem (YANG & WU, 2023). Embora haja poucos relatos de eventos adversos relacionados ao consumo de probióticos em animais de pequeno porte, ainda se faz necessário abordar a segurança do consumo para os animais-alvos, fabricantes e proprietários. Um exemplo é o fato de linhagens do gênero *Enterococcus*, bactéria intestinal comum em cães e gatos, utilizadas como probiótico, não ser utilizadas em alguns países devido ao risco de infecção do hospedeiro pela transferência de genes de resistência antimicrobiano (LEE et al., 2022). Os *Enterococcus* possuem de maneira intrínseca a resistência a várias classes de antibiótico, além de serem microrganismos oportunistas que podem colonizar o intestino e, posteriormente atuar como

doadores de genes de resistência antimicrobiana para a microbiota indígena (BORTOLAIA et al., 2016).

O alvo direto dos probióticos é o trato gastrointestinal; porém, os efeitos benéficos desde consumo podem ser locais ou sistêmicos, atuando por múltiplos mecanismos de ação (YANG & WU, 2023). Estudos têm demonstrado que o uso de probióticos exercem atividade profilática ou terapêutica em doenças como diarreia, câncer de cólon, alergias e diabetes tipo 2 (AINDELIS et al, 2020; ANATRIELLO et al, 2019; DANG et al, 2018; YUE et al, 2020).

O intestino, estando diretamente em contato como o ambiente externo, desempenha um papel crucial na defesa contra infecções, permitindo a absorção de nutrientes e prevenindo a invasão por patógenos (HALLORAN & UNDERWOOD, 2019). A barreira intestinal, composta por células epiteliais, junções estreitas entre essas células, camada de muco e a atividade imunológica da lâmina própria (linfócitos, macrófagos e células dendríticas), limita a translocação bacteriana, e os probióticos contribuem para a manutenção ao reduzir a permeabilidade intestinal, alterando a camada de muco e as proteínas das junções estreitas (HALLORAN & UNDERWOOD, 2019). Além disso, conforme destacado por Plaza-Dias et al. (2019), os probióticos ajudam na exclusão competitiva de patógenos, competindo por sítios de receptores no trato gastrointestinal, sendo os mecanismos propostos para a exclusão bacteriana a redução do pH luminal, a competição por fontes nutricionais e a produção de bacteriocinas ou similares (PLAZA-DIAZ et al., 2019).

Os probióticos influenciam a resposta imunológica inata e adaptativa do hospedeiro ao modular as células imunes como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B e T (HALLORAN & UNDERWOOD, 2019, MAZZIOTTA et al., 2023). Na superfície intestinal, incluindo o epitélio e o tecido conjuntivo subjacente, onde contém células efectoras do sistema imunológico, ocorrem as principais interações entre células intestinais e probióticos (HALLORAN & UNDERWOOD, 2019). As bactérias probióticas ativam as células epiteliais por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), estimulando as células T reguladoras que mantêm a homeostase imune na mucosa intestinal, enquanto antígenos intestinais são transferidos para células dendríticas por enterócitos, conhecidos por células microdobradas (células M), que processam e apresentam os probióticos para a células T, e as direciona para as células T auxiliares Th1, Th2, Th17 ou padrões regulatórios (MAZZIOTTA et al., 2023). Os probióticos também regulam a produção de imunoglobulina (Ig) A pelas células B, que ajudam

a controlar a adesão bacteriana ao tecido intestinal ao se ligarem e neutralizarem antígenos estranhos de agentes patogênicos (HALLORAN & UNDERWOOD, 2019).

A população microbiana intestinal de felinos pode ser influenciada por fatores como dieta, estado de saúde e estilo de vida, com o aumento de bactérias patogênicas durante períodos de estresse e infecção, o que pode levar a problemas digestivos como redução de apetite, vômitos e diarreia (LEE et al., 2022). A suplementação da dieta de gatos com probiótico pode ser uma alternativa para aumentar o número de bactérias benéficas em felinos (ZHA; ZHU; CHEN, 2024). Alguns candidatos a probióticos melhoram a saúde de felinos (LEE et al., 2022); entretanto, os efeitos dos probióticos na promoção da saúde ainda não estão totalmente confirmados e os mecanismos não foram completamente esclarecidos (ZHA; ZHU; CHEN, 2024). Além disso, faltam informações sobre as características inerentes de cada linhagem probiótica (LEE et al., 2022).

O trato gastrointestinal dos felinos possui grande variabilidade microbiana com potencial probiótico, porém, ainda se faz necessário estudos para isolar e caracterizar linhagens bacterianas com potencial probiótico que possam trazer impacto na saúde e bem-estar dos gatos.

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

O objetivo geral deste trabalho foi obter linhagens de bactérias ácido-láticas da cavidade oral e de fezes de gatos, isoladas, identificadas e com o potencial probiótico comprovado por ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os objetivos específicos foram:

1. Isolar bactérias lácticas de fezes e da cavidade oral de gatos domésticos recém-desmamados, sem distinção de raça, que não tivessem sido submetidos, bem como as suas genitoras a antibioticoterapia;
2. Identificar as linhagens bacterianas isoladas;
3. Avaliar a capacidade de crescimento em aerobiose;
4. Avaliar as linhagens isoladas quanto à sensibilidade ao suco gástrico artificial e a sais biliares;
5. Avaliar a hidrofobicidade da superfície celular;
6. Avaliar a capacidade hemolítica das bactérias isoladas;
7. Avaliar a produção de exopolissacarídeos;
8. Avaliar o potencial de auto-agregação e co-agregação com patógenos;
9. Avaliar *in vitro* o antagonismo das bactérias isoladas contra bactérias patogênicas;
10. Avaliar a susceptibilidade a antibióticos;
11. Avaliar a produção de gelatinase;
12. Avaliar o efeito protetor de linhagens selecionadas por testes *in vitro* em modelo murino de infecção por *Salmonella* Typhimurium.

3. METODOLOGIA

3.1 Isolamento, identificação, manutenção e cultivo de bactérias

Após o consentimento livre e esclarecido de seus respectivos tutores (ANEXO A), foram realizadas coletas de fezes e *swab* oral em cinco filhotes de gato doméstico (*Felis catus*), de qualquer raça, com aproximadamente 40 dias de vida, que não tivessem recebido outra dieta a não ser o leite materno e que não tivessem sido submetidos a antibioticoterapia. Esse procedimento contou com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, número 177/2023) (ANEXO B). Após a coleta, o material experimental foi armazenado a 4°C e processado no menor tempo possível. Todas as amostras foram homogeneizadas e diluídas em água peptonada, plaqueadas em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e incubadas em jarras de anaerobiose por 24 - 48 horas a 37°C. As colônias com morfotipos diferentes foram cultivadas em caldo MRS, por 24 horas a 37°C. Para a identificação preliminar, os isolados foram submetidos à coloração de Gram e exame de morfologia bacteriana. Bactérias Gram positivas, com morfologia de bacilos ou cocobacilos, foram testados para a atividade da catalase. Aqueles isolados com resultado negativo para catalase foram considerados como prováveis bactérias lácticas e foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da identificação final, por espectrometria de massa MALDI-TOF (OLIVEIRA et al., 2020; ZANIRATI et al., 2015). Para a verificação da capacidade de crescimento em aerobiose, as linhagens isoladas foram cultivadas por duas vezes consecutivas em caldo MRS incubado a 37°C durante 24 horas em anaerobiose. Em seguida, foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37°C em aerobiose. O acompanhamento do crescimento foi realizado durante 24 horas por leitura de densidade ótica a 600nm e contagem de colônias em placas. Antes de cada experimento subsequente, as linhagens isoladas e selecionadas por sua capacidade de crescer em aerobiose foram cultivadas duas vezes em caldo MRS com 4% v/v de uma cultura estacionária fresca e incubado a 37°C durante 24 horas em aerobiose (ZANIRATI et al., 2015).

3.2 Sensibilidade a suco gástrico artificial

Em dois microtubos foram distribuídos 100µL de suspensão de cada linhagem, crescidas como descrito no item 3.1. Estes foram centrifugados a 13000 rpm (Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuge 8R), por 1 minutos. Ao precipitado de cada tubo foi adicionada 1mL de solução salina 0,85% com pH 7,0 (tubo controle) ou 1mL suco gástrico artificial (NaCl

2 g/L, pepsina 3,2 g/L, pH 2,5), diluindo-os 10x. Os microtubos foram incubados a 37 °C por 2 horas e, posteriormente, centrifugados nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi ressuspensionado em caldo MRS. Para avaliar a viabilidade das células, alíquotas de 200 µL dos inóculos do controle e das amostras tratadas com suco gástrico artificial foram aplicadas, em triplicata, em poços de microplaca. As placas foram incubadas em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37 °C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de DO 600nm a cada 30 minutos, durante 24 horas e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela fórmula $(CT-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente. As linhagens foram classificadas como: sensíveis (% inibição > 60%), tolerantes ($60\% \geq \% \text{ inibição} \geq 40\%$) ou resistentes (% inibição < 40%) (SILVA et al, 2013). O ensaio foi realizado em duplicata.

3.3 Sensibilidade à sais biliares

Para avaliar a resistência aos sais biliares foi adaptado a partir do protocolo de Silva et al. (2013). Foram preparados inóculos a 2% v/v em caldo MRS puro (controle) ou MRS suplementado com 0,30% de sais biliares. A fim de avaliar a viabilidade das células, 200 µL dos inóculos do controle e das amostras desafiadas com sais biliares foram distribuídas, em triplicata, nos poços de microplaca. As placas foram incubadas a 37°C em leitor ELISA (*Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices*). A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de DO 600nm a cada 30 minutos durante 18 horas, e o percentual de inibição de crescimento foi calculado pela fórmula $(CT-SB/CT) \times 100$, sendo SB e CT correspondem à área sob as curvas de crescimento das bactérias na presença de sais biliares e do controle, respectivamente. As linhagens foram classificadas como sensíveis (% inibição > 60%), tolerantes ($60\% \geq \% \text{ inibição} \geq 40\%$) e resistentes (% inibição < 40%). O ensaio foi realizado em duplicata.

3.4 Hidrofobicidade da superfície celular

As medidas de hidrofobicidade celular foram determinadas através da adesão a solventes, determinado pelo MATS (*Microbial Adhesion to Solvents*). As culturas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS (solução salina, pH=7,4) e ressuspensionadas com solução de KNO₃ (0,1 M, pH 6,2). A turbidez foi ajustada para uma DO 600nm de 0,6-0,9 (A0). Um volume de 0,6 mL de xileno (solvente apolar) foi adicionado a 3,6 mL da suspensão

microbiana e após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas por 2 minutos em vórtex. A fase aquosa foi removida após 50 minutos de repouso e sua DO 600nm foi medida (A1). A porcentagem de MATS foi calculada segundo a fórmula $(A0 - A1 / A0) \times 100$, onde A0 é a medida da turbidez ajustada e A1 a medida turbidez após repouso. Bactérias láticas com resultados de % MATS > 66% foram classificadas como hidrofóbicas; % MATS entre 33% e 66%, classificadas como moderadamente hidrofóbicas e % MATS < 33%, classificadas como hidrofílicas (SILVA et al, 2013). O experimento foi realizado em duplicata.

3.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeos

A verificação de produção de exopolissacarídeos (EPS) foi observada através do crescimento dos microrganismos estriados em três diferentes meios de cultura: ágar MRS e ágar MRS modificado por substituição da glicose (2%) por sacarose (8%) (sMRS) ou lactose (5%) (lMRS). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas. Foram considerados produtores de EPS as linhagens que apresentaram colônias viscosas nos meios acrescidos dos açúcares lactose ou sacarose (PAIVA et al., 2016). Para controle positivo foi utilizado uma linhagem de *Weissella paramesentroides* WpK4 produtora de EPS.

3.6 Potencial de auto-agregação

Quatro mililitros de cada linhagem após crescimento em caldo MRS foram centrifugados a 1400 rpm (*Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuse 8R*) por 10 minutos, lavados duas vezes com solução salina 0,85% e ajustada para uma DO 600 nm de 0,6-0,7. Em um microtubo foi colocado 1 mL da amostra e agitado por 2 minutos em vórtex. Em seguida, as amostras permaneceram em repouso por 2 horas. Após esse período, 100 µL da porção superior da suspensão do tubo foram retirados para a leitura da absorbância final a 600nm. Os resultados foram obtidos através da fórmula: $1 - (AT/A0) \times 100$, na qual AT corresponde à absorbância no tempo 2 horas e A0, a absorbância no tempo 0. As linhagens foram classificadas quanto à autoagregação como alto (67-100%), médio (34 - 66%) e baixo (0 - 33%) (STEINBERG et al., 2022).

3.7 Potencial de co-agregação com patógenos

Os experimentos de co-agregação foram realizados com as seguintes bactérias patogênicas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhimurium* (ATCC 14028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 292130). Os patógenos pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biologia e Biotecnologia de Bactérias e estão conservadas em criotubos contendo caldo BHI (Acumedia) acrescido de 20% glicerol (80% v/v), mantidos em freezer -80 °C. Antes de cada experimento, os patógenos foram ativados no mínimo duas vezes em caldo BHI e incubados em aerobiose por 24 horas a 37°C.

Bactérias lácticas e patógenos foram cultivados a 37°C em 10 mL de caldo MRS e caldo BHI, respectivamente. Em seguida, foram centrifugados a 1400 rpm (*Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuge 8R*) por 10 minutos, lavadas 2 vezes com solução salina 0,85%, homogeneizados em 10 mL desta mesma solução e ajustada para uma DO 600 nm de 0,6-0,7. Para os tubos controle, 2 mL de cada suspensão de bactérias lácticas e 2 mL de suspensão de cada patógeno foram retirados e agitados por 2 minutos antes da leitura da absorbância a 600 nm. Nos demais tubos, 1 mL de cada linhagem foi misturado com 1 mL de cada patógeno, sendo agitados por 2 minutos antes da leitura da absorbância a 600 nm. Após 3 horas de manutenção das amostras em repouso, 100 µL da porção superior da suspensão contida em cada tubo foram retirados para leitura da absorbância a 600 nm. O experimento foi realizado em duplicata. Os resultados foram obtidos através da fórmula, sendo AX a absorbância do tubo controle das bactérias lácticas e AY o controle do patógeno, enquanto A(X+Y) corresponde à absorbância do tubo contendo a mistura (BAL + PAT): % Co-agregação = $\{[(AX + AY)/2 - A(X + Y)] / (AX + AY) / 2\} \times 100$. As linhagens foram classificadas quanto à co-agregação como alto (67-100%), médio (34 - 66%) e baixo (0 - 33%) (STEINBERG et al., 2022).

3.8 Teste de antagonismo in vitro contra bactérias patogênicas

O teste *in vitro* para verificar a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla, adaptado de Silva et al. (2013), em duplicata. Foram utilizados os mesmos patógenos do ensaio de co-agregação. Cinco microlitros de cada cultura de bactéria láctica foram inoculados no centro de uma placa contendo ágar MRS, seguindo-se incubação a 37°C por 24-48 horas para o crescimento do microrganismo. Para interromper a multiplicação microbiana, a cultura foi exposta ao vapor de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida, as placas foram abertas pelo mesmo tempo para evaporação do solvente

residual. Uma sobrecamada de 5 mL de ágar BHI semi-sólido, inoculada com 25 µL (0,5% v/v) de uma cultura bacteriana patogênica reveladora, será espalhada sobre o ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas e o diâmetro dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). As amostras foram consideradas produtoras de substâncias antagonistas quando houver halo de inibição de crescimento da bactéria reveladora, independentemente do tamanho.

3.9 Avaliação da capacidade hemolítica

Para determinar a atividade hemolítica, as linhagens foram estriadas em placas de ágar MRS adicionado de 5% v/v de sangue de carneiro desfibrinado. Em seguida foram incubadas até 48 horas a 37°C. Para o controle positivo da β-hemólise foi utilizado uma linhagem de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). O desenvolvimento de uma zona clara de hemólise em torno das colônias foi considerado como resultado positivo. O experimento foi realizado em duplicata (FADDA et al., 2017).

3.10 Avaliação da produção de gelatinase

Tubos contendo caldo MRS suplementado com 12% de gelatina foram inoculados com três colônias de cada linhagem, utilizando uma agulha de repicagem, e incubados a 37°C por 72 horas. Após incubação, os tubos foram refrigerados por 30 minutos e, em seguida, foram verificados se houve solidificação completa do meio (gelatinase negativa) ou se permaneceu líquido (gelatinase positiva) (OLIVEIRA et al., 2020).

3.11 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos, em duplicata. Para cada antimicrobiano testado, os microrganismos foram classificados como sensível, moderadamente sensível ou resistente de acordo com os pontos de corte sugeridos por CHARTERIS et al. (1998) e ANVISA (2005). Para este teste, as culturas foram inoculadas em ágar MRS e incubadas a 37°C por 24-48h, em aerobiose. A partir da cultura em meio sólido, foram preparadas suspensões de cada linhagem em solução salina 0,85% (p/v), esterilizada, até atingir a turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a cerca de 10⁸ UFC/mL. Alíquotas de 0,1 mL das suspensões bacterianas foram então semeadas em ágar MRS com o auxílio de

um *swab* estéril. Em seguida os discos antimicrobianos - foram Doxiciclina (30µg), Clorafenicol (30µg), Amoxicilina (10µg), Cefazolina (30µg), Cefoxitina (30µg), Marbofloxacina (5µg), Enrofloxacina (5µg), Cefalexina (30µg), Ceftriaxona (30µg), Penicilina (10 U) - foram depositados sobre a superfície da placa e incubadas a 37°C por 24-48 horas, em aerobiose e a medida dos halos de inibição foram realizadas com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão).

3.12 Avaliação do potencial probiótico *in vivo* – Modelo murino de infecção por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com 3-4 semanas de idade fornecidas pelo Biotério Central/ UFMG. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), mantidos em sistema de gaiolas ventiladas em biotério com iluminação controlada (12 horas de luz e 12 horas de escuro), umidade (60 – 80%) e temperatura (22 ± 5°C), recebendo água e dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil) *ad libitum*. Esse experimento conta com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, número 177/2023) (ANEXO B).

Para o ensaio de sobrevivência foi adaptado de ALVIM et al (2016), os animais foram divididos em quatro grupos contendo 12 animais em cada, sendo 1 grupo controle e 3 experimentais. Para os grupos experimentais, três isolados foram selecionados baseados nos ensaios *in vitro* quanto às suas características funcionais e de segurança, e para o grupo controle foi utilizado solução salina à 0,85%. As culturas puras das linhagens selecionadas ou a solução salina foram administradas diariamente nos animais por gavagem (100µL da suspensão contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL) durante todo o experimento. No 10º dia de administração das linhagens selecionadas os animais foram desafiados com 100 µL de suspensão contendo 10⁷ UFC/mL da bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 14028), previamente cultivada em caldo BHI por 24h a 37°C. A administração oral das linhagens selecionadas ou solução salina continuaram até o final do experimento. A sobrevivência e desenvolvimento ponderal foi observado até o 38º dia (ALVIM et al, 2016).

3.13 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados no *GraphPad Prism Versão 8* (*GraphPad software Inc.*, San Diego, CA, Estados Unidos), sendo considerados como diferença estatística os valores com

nível de significância inferior a 5%. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelos pós-testes quando necessário (Tukey ou teste t).

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento, caracterização morfofisiológica e identificação dos isolados

Inicialmente as amostras passaram por uma diluição seriadas e a plaqueadas em duplicatas. A diluição 10^7 foi contada obtendo uma média de $1,33 \times 10^{10}$ UFC/g na primeira amostra, $1,50 \times 10^{10}$ UFC/g na segunda amostra e $2,38 \times 10^{10}$ UFC/g na terceira amostra de fezes de gato.

Quarenta e nove isolados bacterianos foram obtidos de 3 amostras de fezes e 10 de saliva de filhote de gatos e submetidos à coloração de Gram e teste de catalase. Trinta e quatro foram selecionadas após identificação preliminar, por atenderem às características das bactérias lácticas, ou seja, sendo essas Gram positivas como morfologia de bacilo ou cocos, e catalase negativa. Após a identificação preliminar os 34 isolados foram encaminhados para identificação final por espectrometria de massa MALDI-TOF (**Tabela 1**).

Tabela 1: Identificação bacteriana dos isolados felinos.

Isolado	Local	Espécie	Isolado	Local	Espécie
A6C	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S3A	Saliva	<i>Enterococcus hirae</i>
6E	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S4A	Saliva	<i>Enterococcus hirae</i>
A6F	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S5B	Saliva	<i>Enterococcus hirae</i>
6G	Fezes	<i>Staphylococcus hominis</i>	S6D	Saliva	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A6H	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S6E	Saliva	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A7A	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S9A	Saliva	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A7B	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S9C	Saliva	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A7D	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S10B	Saliva	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A7E	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	6 A1	Fezes	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
A7J	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	A6D2	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A7K	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	7C1	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A8C	Fezes	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	A7F2	Fezes	<i>Staphylococcus warnei</i>
A8E	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	A7G1	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
A8G	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	A7H2	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>

8H	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	A7I1	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
8K	Fezes	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S6A	Saliva	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S2A	Saliva	<i>Enterococcus hirae</i>	S6B	Saliva	<i>Staphylococcus caprae</i>

Ao todo, 34 isolados foram identificados, sendo 23 (67,65%) provenientes de amostras fecais e 11 (32,35%) da cavidade oral de felinos. Dentre as espécies encontradas, 20 (70,59%) pertenciam a *Limosilactobacillus reuteri*, 1 (2,94%) a *Limosilactobacillus mucosae* e 1 (2,94%) a *Lactiplantibacillus plantarum*. Além de 8 isolados entre *Staphylococcus* ssp. (11,76%) e *Enterococcus* ssp. (11,76%) (**Figura 1**).

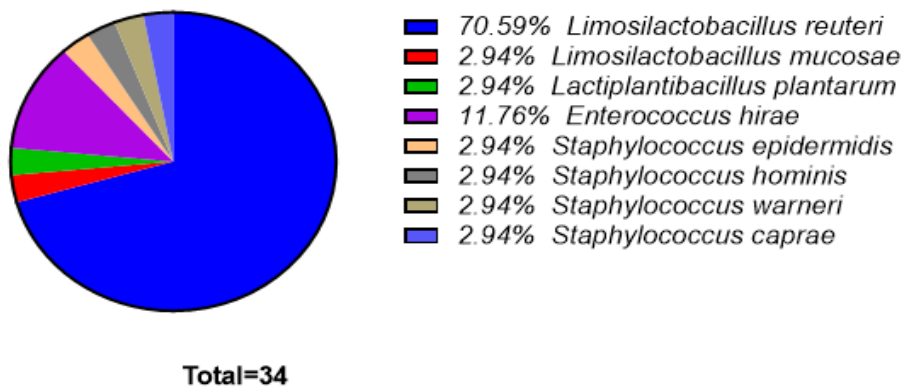


Figura 1: Gráfico de diversidade das espécies isoladas em felinos.

4.2 Caracterização probiótica *in vitro*

A caracterização das propriedades funcionais *in vitro* observa o comportamento específico das linhagens e estabelece critérios para seleção de testes *in vivo* posteriores.

4.2.1 Resistência a suco gástrico

Para analisar a resistência dos isolados de felinos a suco gástrico, os microrganismos foram inoculados em suco gástrico artificial com pH 2,5 por 2 horas e o crescimento em MRS dos isolados foi acompanhado por 24 horas. Os dados foram compilados em gráficos e o percentual de inibição foi calculado pela diferença da área sob a curva de crescimento gerada do controle em relação aos microrganismos que tiveram contato com suco gástrico (**Tabela 2**).

Tabela 2: Percentual de inibição frente ao desafio de suco gástrico

Isolados		Classificação	% inibição Média	SD ¹
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	6,18	1,39
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	22,63	18,86
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	18,16	25,34
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	SENSÍVEL	88,53	1,45
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	10,35	0,34
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-4,77	13,46
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	1,78	1,41
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	6,61	3,83
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	8,77	1,00
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	12,40	11,66
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	5,92	4,24
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	RESISTENTE	-69,37	1,64
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	47,83	54,01
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	10,55	14,21
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	7,89	13,48
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	19,64	20,10
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	14,71	19,83
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	9,49	8,07
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	21,27	4,43
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	29,83	3,22
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-1,85	5,41
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-10,51	16,91
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-2,98	1,25
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	12,28	4,87
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	1,38	2,13
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	RESISTENTE	19,71	3,61
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	4,36	19,93
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-9,03	1,71
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	SENSÍVEL	83,25	13,56
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-3,57	1,92
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-6,44	3,91
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	-8,06	1,75
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SENSÍVEL	79,25	15,19
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	SENSÍVEL	89,75	3,49

¹ SD – Desvio Padrão.

Como pode ser observado na **Tabela 2**, 29 isolados (85,29%) expostos ao suco gástrico artificial mostraram-se resistentes, apresentando percentuais de inibição inferiores a 40%. As amostras *Staphylococcus hominis* – 6G, *Staphylococcus warnei* – A7F2, *Staphylococcus epidermidis* – S6A e *Staphylococcus caprae* – S6B foram classificadas como sensíveis, com percentuais de inibição superiores a 60%. Apenas uma amostra, *Limosilactobacillus reuteri* – A8E, foi considerada tolerante com o percentual de inibição entre 40 e 60% (47,83%). No **Apêndice A** é mostrado os gráficos com a cinética de crescimento de cada um dos isolados.

4.2.2 Resistência a sais biliares

A resistência a sais biliares foi avaliada observando o crescimento dos isolados na presença de sais biliares (Oxgall) por 18 horas. A curva de crescimento foi avaliada pela diferença da área sob a curva na ausência (MRS puro) ou presença (MRS + 0,3% Oxigall) de sais biliares e classificados quanto a sua tolerância, como pode ser observado na **Tabela 3**.

Tabela 3: Percentual de inibição e classificação dos isolados quanto à tolerância a sais biliares

Isolados	Classificação	% inibição Média	SD ¹	
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	69,00	5,10
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	58,75	29,24
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	68,97	6,12
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	TOLERANTE	56,79	9,33
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	59,89	9,47
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	61,14	1,43
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	43,27	11,36
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RESISTENTE	37,21	17,52
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	58,10	0,65
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	43,68	2,20
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	63,92	12,11
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	TOLERANTE	47,38	4,74
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	59,67	2,74
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	50,33	7,88
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	51,53	5,58
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	59,45	23,96
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	8,13	8,25
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	9,49	9,93
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	9,34	0,05
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	RESISTENTE	12,45	8,09
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	44,36	128,70
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	62,45	2,94
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	63,84	1,52
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	58,02	0,72
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	84,33	2,02
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	RESISTENTE	29,32	7,64
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	54,45	3,74
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	TOLERANTE	55,40	2,94
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	SENSÍVEL	86,01	0,05
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	74,12	4,12
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	67,40	5,15
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	SENSÍVEL	64,66	4,99
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RESISTENTE	39,52	0,97
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	TOLERANTE	40,65	1,36

¹ SD – Desvio Padrão.

O desafio à sais biliares se mostrou um fator de segregação uma vez que apenas 20,59% dos isolados se mostraram resistente a presença de sais biliares. Os isolados resistentes foram:

Limosilactobacillus reuteri – A7D, *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1, *Enterococcus hirae*-S2A, *Enterococcus hirae* – S3A, *Enterococcus hirae* – S4A, *Enterococcus hirae* – S5B e *Staphylococcus epidermidis* – S6A. Entretanto, os percentuais de isolados tolerantes ou sensíveis foram de 47,06% e 32,35%, respectivamente.

As figuras abaixo ilustram as curvas de crescimento classificadas como resistente (**Figura 2**), tolerante (**Figura 3**) e sensível (**Figura 4**) à presença de sais biliares. No **Apêndice B**, são mostrados os gráficos com a cinética de crescimento de cada um dos isolados, tanto na presença quanto na ausência de sais biliares (0,3% Oxgall).

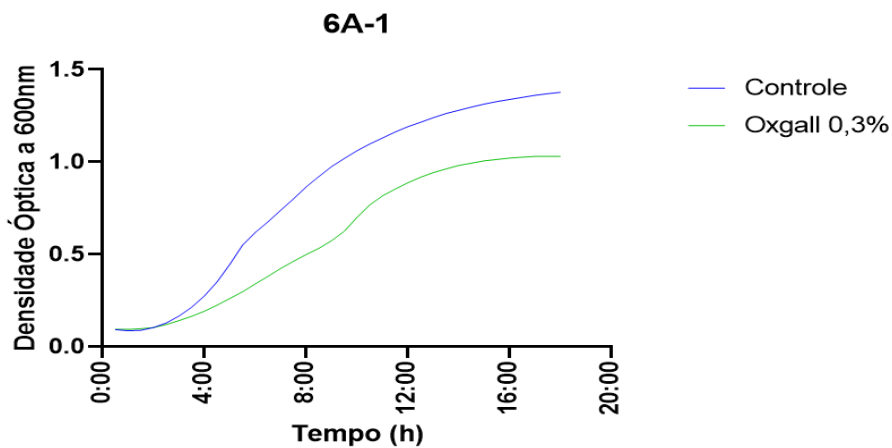


Figura 2: Curva de crescimento do isolado *Lactiplantibacillus plantarum* - 6A1 resistente a sais biliares (Oxgall 0,3%).

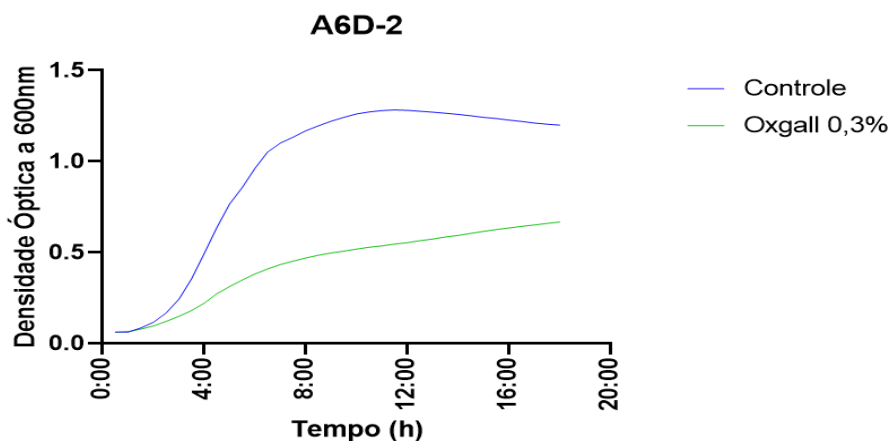


Figura 3: Curva de crescimento do isolado *Limosilactobacillus reuteri* - A6D2 tolerante a sais biliares (Oxgall 0,3%).

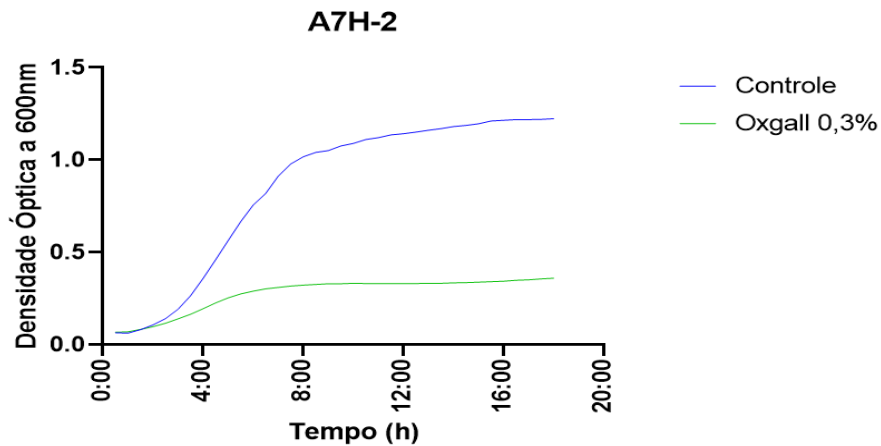


Figura 4: Curva de crescimento do isolado *Limosilactobacillus reuteri* - A7H2 sensível a sais biliares (Oxgall 0,3%).

4.2.3 Hidrofobicidade da superfície celular

Para avaliar a hidrofobicidade da superfície celular dos isolados foi utilizado o teste de MATS utilizando o hidrocarboneto xileno como solvente orgânico. Os isolados foram classificados como hidrofóbicos (% MATS > 66%), moderadamente hidrofóbicos (% MATS entre 33% e 66%) e hidrofílicos (% MATS < 33%), como demonstrado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Teste de adesão dos microrganismos a solventes

	Isolados	% MATS	SD ¹
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 2,41	3,34
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 2,56	14,29
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 1,85	6,61
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	10,08	6,37
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 10,65	21,91
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 12,23	16,77
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 11,02	24,40
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 5,66	7,39
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 0,39	6,99
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 2,57	9,87
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	6,42	11,47
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	20,18	25,33
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	11,27	18,85
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	7,81	5,48
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 8,74	3,94
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 3,16	4,79
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	12,39	6,74
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	1,36	5,75
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	7,85	4,49
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	10,31	4,24
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 2,27	6,65
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,74	9,54
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	0,20	3,34
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	0,39	6,36

S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 2,75	9,77
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	35,99	46,00
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	0,55	16,71
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	9,39	13,33
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	65,37	20,81
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 3,16	5,99
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 12,38	10,96
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	- 4,97	17,69
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	- 7,45	10,22
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	8,47	58,82

1 SD – Desvio Padrão.

O teste de adesão a solvente foi realizado em triplicada e apenas 2 microrganismos mostraram-se moderadamente hidrofóbicos, com %MATS superior a 33%, sendo estes *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 e *Staphylococcus warnei* – A7F2. Todos os outros 32 isolados foram classificados como hidrofílicos, com valores inferiores a 33%.

4.2.4 Produção de Exopolissacarídeos

A produção de EPS, foi observada pelo o crescimento dos isolados nos diferentes meios de cultura, sendo esses o ágar MRS e o MRS modificado por substituição da glicose por sacarose ou lactose. Percebeu-se dificuldade das colônias em crescer nos meios modificados, observando pouco ou nenhum crescimento dos isolados como mostrado na **Figura 5**.

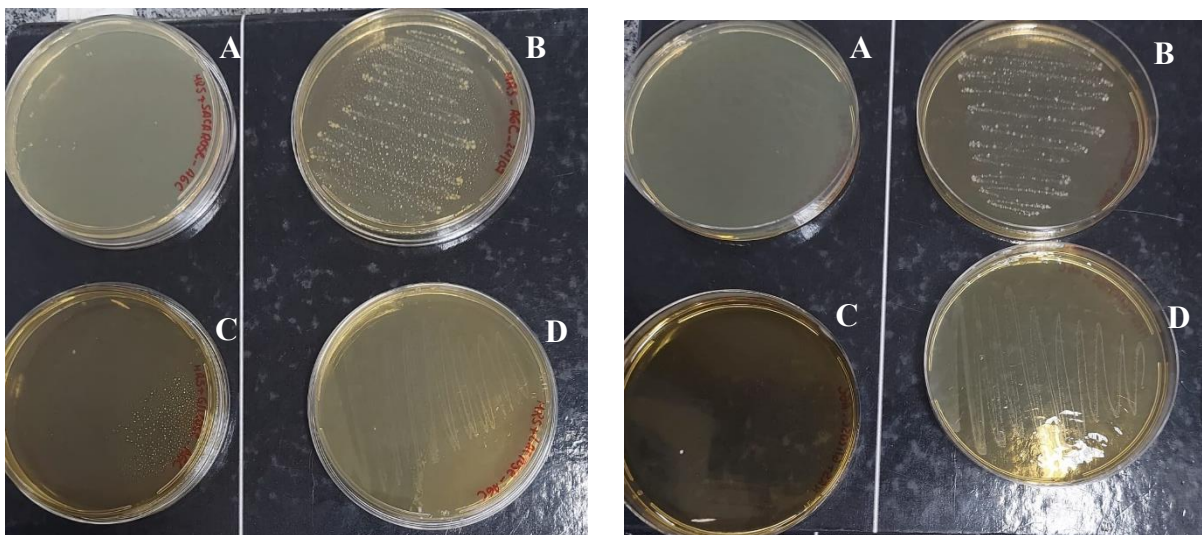


Figura 5: Crescimento do isolado A6C *Limosilactobacillus reuteri* nos meios com substituição da glicose. MRS modificados por substituição da glicose: (A) sMRS (MRS + 8% de sacarose), (B) ágar MRS industrial, (C) gMRS (MRS +2% de glicose), (D) lMRS (MRS+5% de lactose).

Noves dos 34 isolados cresceram nos meios em que a glicose foi substituída por sacarose ou lactose, como pode ser mostrado na **Tabela 5**. Entretanto, não foi observada a produção de

EPS pelos isolados (**Figura 6**), ou seja, não foram observadas colônias com aspecto viscoso nos meios acrescidos dos açúcares lactose e sacarose.

Tabela 5: Crescimento dos isolados nos meios modificados

Isolados	MRS	gMRS	sMRS	IMRS
A6C <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
6E <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A6F <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
6G <i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	+	±
A6H <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7A <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7B <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7D <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7E <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7J <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A7K <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A8C <i>Limosilactobacillus mucosae</i>	+	-	-	-
A8E <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
A8G <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
8H <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
8K <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	±	±
S2A <i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	+
S3A <i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	+
S4A <i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	+
S5B <i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	+
S6D <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	-	±
S6E <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
S9A <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
S9C <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	±	±
S10B <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	±	±
6 A1 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	+	+	+
A6D2 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	±	±
7C1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	-	-	±
A7F2 <i>Staphylococcus warnei</i>	+	+	+	+
A7G1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	±	±
A7H2 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	-	±
A7I1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	±	±	±
S6A <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+
S6B <i>Staphylococcus caprae</i>	+	+	+	+

O “+” representa que houve crescimento do isolado, “-” representa que não houve crescimento e “±” representa que houve pouco crescimento.

MRS modificados por substituição da glicose: gMRS (MRS +2% de glicose), sMRS (MRS + 8% de sacarose), IMRS (MRS+5% de lactose).

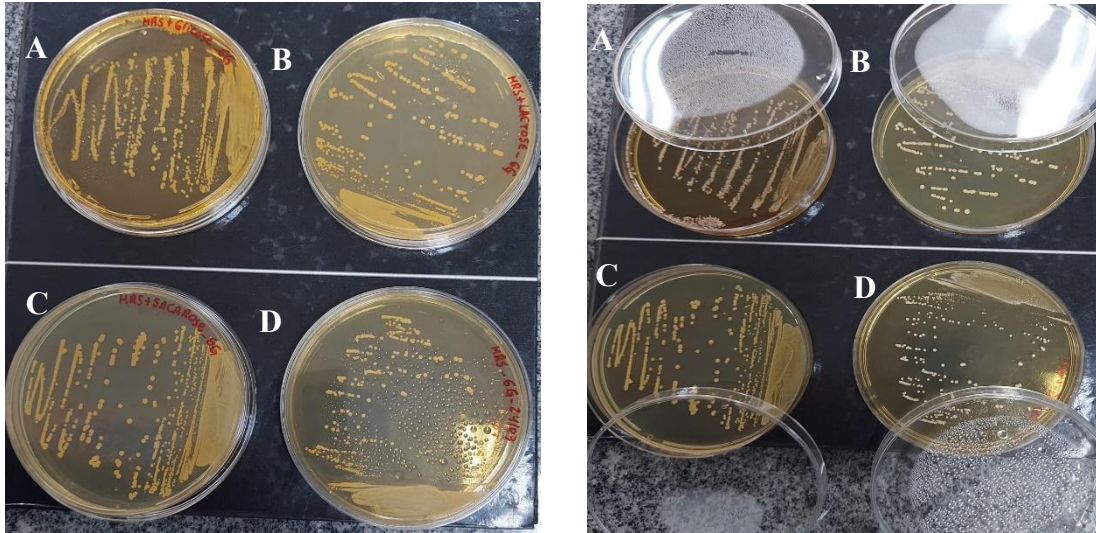


Figura 6: Crescimento do isolado 6G, *Staphylococcus hominis*, nos meios com substituição da glicose. MRS modificados por substituição da glicose: (A) gMRS (MRS +2% de glicose), (B) IMRS (MRS+5% de lactose), (C) sMRS (MRS + 8% de sacarose), (D) ágar MRS industrial.

4.2.5 Potencial de auto-agregação e co-agregação com patógenos

A capacidade dos isolados se unirem espontaneamente foi avaliada pelo potencial de auto-agregação. Nove (26,47%) amostras obtiveram um potencial de auto-agregação médio com um % de auto-agregação entre 33% e 66%, enquanto as demais foram classificadas como baixo potencial (<33%) (Tabela 6).

Tabela 6: Potencial de auto-agregação dos isolados

Isolados		Classificação	Auto-agregação (%)	SD ¹
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	28,84	19,71
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	MÉDIO	33,20	9,68
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	24,00	3,85
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	MÉDIO	34,14	1,87
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	20,86	10,70
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	MÉDIO	39,15	19,86
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	27,66	1,61
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	26,20	12,13
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	32,81	31,66
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	27,82	16,17
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	26,07	15,11
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	BAIXO	26,68	12,13
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	24,24	8,66
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	MÉDIO	36,02	12,52
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	15,70	1,86
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	24,47	3,53
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	MÉDIO	42,25	7,39
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	MÉDIO	33,21	17,99
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	MÉDIO	39,78	7,01
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	MÉDIO	38,70	10,65

S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	28,37	6,77
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	MÉDIO	40,31	10,45
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	21,14	5,05
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	30,98	13,66
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	21,51	7,19
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	BAIXO	19,99	17,85
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	22,65	11,21
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	29,17	7,98
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	BAIXO	22,81	12,72
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	17,58	7,91
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	24,83	5,09
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	BAIXO	30,46	6,32
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BAIXO	14,19	14,25
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	BAIXO	23,01	12,65

1 SD – Desvio Padrão.

Para avaliar o potencial de co-agregação com patógenos foram utilizados patógenos comuns em enteropatias (Tabela 7).

Tabela 7: Potencial de co-agregação com patógenos

Isolados		Co-agregação (%)				
		Se	Pa	Lm	Ef	Sa
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	57,30	55,36	48,68	29,03	55,37
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	27,78	41,09	48,71	12,51	42,55
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	15,54	54,44	45,75	4,03	45,17
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	44,60	62,76	50,69	33,66	- 20,99
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	32,85	48,55	29,23	7,68	43,57
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,49	43,27	54,18	28,00	40,15
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	40,58	45,10	48,85	48,00	42,21
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	29,12	45,13	42,28	33,25	54,00
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	51,42	59,39	53,67	53,44	49,84
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	34,76	66,04	48,38	49,74	46,87
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	38,67	49,93	46,00	35,11	47,59
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	24,91	32,91	41,38	14,14	28,32
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	50,49	54,75	41,22	5,76	64,25
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	14,92	31,57	31,07	- 9,84	32,34
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	32,41	53,32	30,81	22,24	47,21
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	22,13	39,69	37,38	20,33	38,02
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	33,93	42,53	41,68	16,11	44,60
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	32,82	45,67	43,04	19,32	47,52
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	51,23	47,03	51,24	31,12	58,32
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	45,87	64,04	44,19	41,09	54,10
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	38,13	49,13	51,22	38,22	56,95
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	27,48	47,84	39,04	21,68	56,01
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	37,66	55,56	52,19	27,28	45,09
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	40,69	52,80	38,45	26,48	47,36
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	26,05	49,53	36,76	27,23	57,57
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	34,15	69,09	48,57	30,10	50,91
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	40,87	52,24	43,75	24,15	59,21
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	36,90	45,92	40,40	29,16	47,77
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	36,93	61,28	48,96	35,64	53,15

A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	24,63	47,21	35,19	27,72	43,43
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	32,96	45,80	46,69	34,27	44,96
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	51,71	49,35	52,07	32,64	55,73
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	43,12	48,07	47,94	33,02	56,47
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	15,08	36,94	41,09	13,22	44,28

Se: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Sa: *Staphylococcus aureus*.

Contra os patógenos, os isolados apresentaram um potencial médio de co-agregação (% co-agregação entre 33% e 66%), com dois isolados (*Limosilactobacillus reuteri* – A7J e *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1) exibindo percentuais de co-agregação superiores a 66%, sendo classificados com alto potencial de co-agregação contra *P. aeruginosa*. Para *Salmonella* Typhimurium, 20 isolados (58,8%) foram classificados com médio potencial de co-agregação, com o percentual entre 33,49% (*Limosilactobacillus reuteri* – A6C) e 57,30% (*Limosilactobacillus reuteri* – A7A).

4.2.6 Antagonismo a bactérias patogênicas

Os isolados foram mantidos em ágar MRS para crescimento, permitindo a produção e difusão de substâncias antagônica, em seguida foram utilizadas as mesmas bactérias patogênicas utilizadas para o teste de co-agregação para observar o efeito das substâncias produzidas pelos isolados. Os resultados podem ser observados na **Tabela 8** categorizado como positivo (+) ou negativo (-) baseado no tamanho dos halos de inibição.

Tabela 8: Atividade antagonista contra patógenos

Isolados		Presença de zonas de inibição de crescimento				
		Se	Pa	Lm	Ef	As
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	+	-	+
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	-	+	+
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	-	-	+
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	+	+	+
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	+	+	+
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	+	+	+
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	+	+	+
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	+	-	-	-	-
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	-	+	-	-
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	-	-	+	-
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	+	-	-
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	+	-	-
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	-	+

S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	-	-
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	+	+	+	-	+
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	+	-	-	-
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	+
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	-	-	+	-	-
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	+	+	+
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	-
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	+	+	+	-
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	+
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	-	-	-	-	-

Foram utilizadas as bactérias as seguir para revelar atividade antagônica, Se: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Sa: *Staphylococcus aureus*. + = presença de zonas de inibição de crescimento; - = ausência de zona de inibição de crescimento.

Dos 34 isolados, apenas o *Staphylococcus caprae* – S6B não apresentou produção de substâncias antagônica às bactérias patogênicas reveladoras. Todos os outros isolados mostraram atividade antagônica contra pelo menos 1 bactéria patogênica, como mostrado na **Tabela 8**. Os isolado *Limosilactobacillus reuteri* – A7K, *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 e *Limosilactobacillus reuteri* - A7G1 apresentaram produção de substâncias inibidoras contra todos 5 patógenos.

O patógeno menos resistente contra as substâncias antagônicas produzidas pelos isolados foi a *P. aeruginosa*, 26 dos 34 isolados foi possível observar zonas de inibição. E a bactéria *S. aureus* foi o mais resistente, apenas 16 dos 34 isolados foi observado atividade antagônicas. No **Apêndice C** é possível observar o tamanho médio dos halos formado pela atividade de substâncias antagônicas produzidas pelos isolados.

Baseados nas características funcionais *in vitro* dos isolado, 10 linhagens foram selecionadas e testada quanto suas características de segurança. Na **Tabela 9**, é possível ver uma síntese dos resultados das propriedades dos isolados selecionados para caracterização de segurança, e no **Anexo D** um resumo de todos os isolados.

Tabela 9: Síntese dos resultados de caracterização dos probiótica dos isolados selecionados para caracterização de segurança

Isolados	SG ¹	SB ¹	MATS	Auto-Agregação	Co-agregação					Antagonismo	
					Se ²	Pa ²	Lm ²	Ef ²	Sa ²		
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	R	R	Hidrofóbica	Baixo	M	A	M	B	M	++++
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++-+-
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++-+-
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	R	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	M	M	-++++
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	-++++
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	A	M	M	M	-++++
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	B	M	B	B	+----
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	M	B	B	M	+++--
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	R	R	Hidrofilica	Médio	M	M	M	M	M	+++--
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++-+-

¹ SG: Suco Gástrico, SB: Sais Biliares, R: Resistente, T: Tolerante, S: Sensível

² Se: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Sa: *Staphylococcus aureus*. A: Alto, M: Médio, B: Baixo

Dos 10 isolados selecionados, as linhagens *Enterococcus hirae* – S5B e *Limosilactobacillus reuteri* – S9C são derivadas da cavidade oral de felinos, enquanto as outras se originaram das fezes desses animais. Todas são resistentes ao suco gástrico, e apenas 3 linhagens (*Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1, *Limosilactobacillus reuteri* – A7D e *Enterococcus hirae* – S5B) são também resistentes a sais biliares; as outras sete linhagens foram classificadas como tolerantes. Nove das linhagens foram classificadas como hidrofílicas, e *Enterococcus hirae* – S5B apresentou um potencial médio de auto-agregação, enquanto as outras apresentaram potencial baixo.

Em relação ao potencial de co-agregação com patógenos, a maioria foi classificada com potencial médio, com destaque as linhagens *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 e *Limosilactobacillus reuteri* – A7J que demonstraram alto potencial de co-agregação contra o patógeno *Pseudomonas aeruginosa*. A linhagem *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 também apresentou antagonismos contra os 5 patógenos testados.

4.3 Características de segurança

4.3.1 Produção de gelatinase e hemólise

Para avaliar a degradação de gelatina e de células vermelhas pelos isolados bacterianos foram utilizados meios suplementados e um patógeno como controle positivo, sendo estes *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, respectivamente.

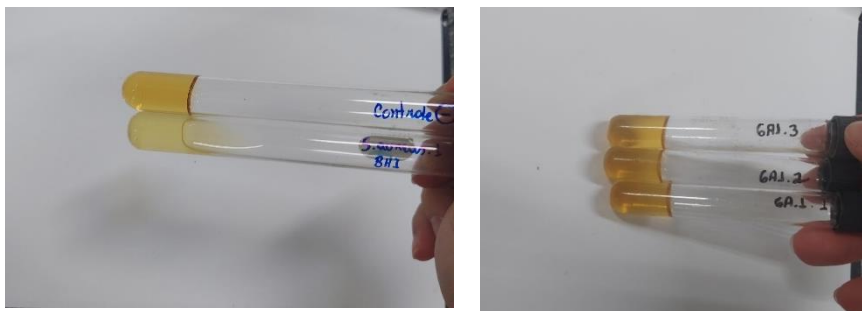


Figura 7: Produção de gelatinase. A esquerda controle positivo (meio sem inóculo) e negativo (meio inoculado com *S. aureus*) da produção de gelatinase, e a direita resultado negativo da amostra *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1.

Os 10 isolados selecionados após caracterização foram negativos para produção de gelatinase e para produção de hemólise. As **Figura 7** e **8** mostram os resultados obtidos.

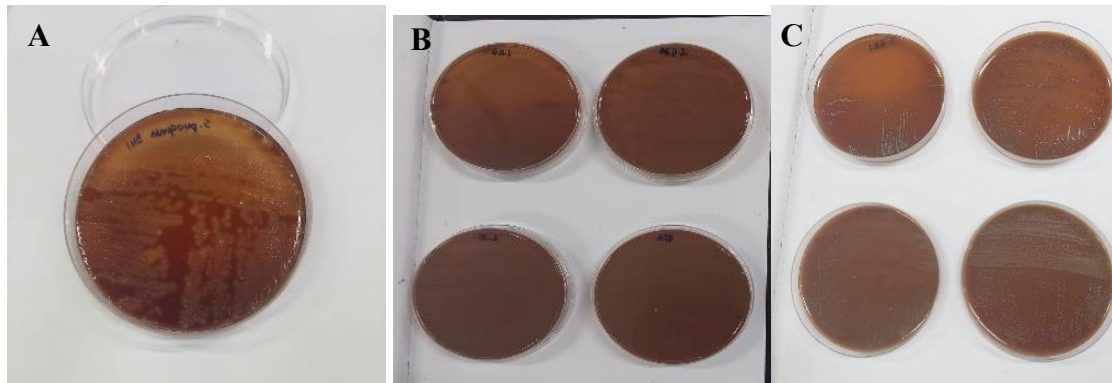


Figura 8: Produção de hemólise: crescimento dos isolados em ágar sangue.

A – Controle positivo com patógeno *Streptococcus pyogenes*, no qual é possível observar zonas claras em torno das colônias, indicativas de hemólise. B e C – Resultados negativos dos isolados felinos; nota-se a ausência de áreas claras ao redor das colônias, características da hemólise.

4.3.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

Para avaliar o perfil antimicrobiano dos isolados foram selecionados antimicrobianos das classes betalactâmicos (Amoxicilina, Cefazolina, Cefalexina, Cefoxitina, Ceftriaxona, Penicilina), fluoroquinolonas (Enrofloxacina, Marbofloxacina), tetraciclina (Doxiciclina) e fenicóis (Clorafenicol). Os resultados encontram-se na **Tabela 10**, classificados como resistentes (R), moderadamente sensível (MS) ou sensível (S) ao antimicrobiano testado e no **Apêndice E** é possível observar o tamanho dos halos formados.

Tabela 10: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados

Isolados	Antibióticos										
	DO	CL	AM	CZ	CF	MR	EN	CE	CR	PE	
6 A1 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	S	MS	
A6D2 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	
7C1 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	
A7D <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	R	R	-	S	S	S	
A7E <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	R	R	-	S	S	S	
A7J <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	R	R	-	S	S	S	
A8C <i>Limosilactobacillus mucosae</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	
8H <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	
S5B <i>Enterococcus hirae</i>	S	S	S	S	S	-	-	S	S	S	
S9C <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	S	S	S	S	S	R	-	R	S	S	

Os antimicrobianos utilizados foram Doxiciclina (DO), Clorafenicol (CL), Amoxicilina (AM), Cefazolina (CZ), Cefoxitina (CF), Marbofloxacina (MR), Enrofloxacina (EN), Cefalexina (CE), Ceftriaxona (CR), Penicilina (PE)

4.4 Teste *in vivo* potencial probiótico

Posteriormente a caracterização de segurança, três isolados (*Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1, *Limosilactobacillus reuteri* – A6D2 e *Limosilactobacillus mucosae* – A8C) foram selecionados para teste *in vivo* quanto ao potencial probiótico. Os animais foram divididos em 4 grupos sendo 1 controle e 3 tratamentos, e foram observados por 38 dias, recebendo tratamento diariamente.

Durante os 10 dias iniciais, os animais do grupo controle foram tratados com solução salina e os outros 3 grupos receberam o tratamento com os probióticos. O grupo controle obteve um percentual de ganho de peso de 8,34% enquanto os grupos de tratamento dos isolados *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1, *Limosilactobacillus reuteri* – A6D2 e *Limosilactobacillus mucosae* – A8C obtiveram 8,72%, 9,71% e 6,72% respectivamente, a **Figura 9** mostra a curva de ganho de peso.

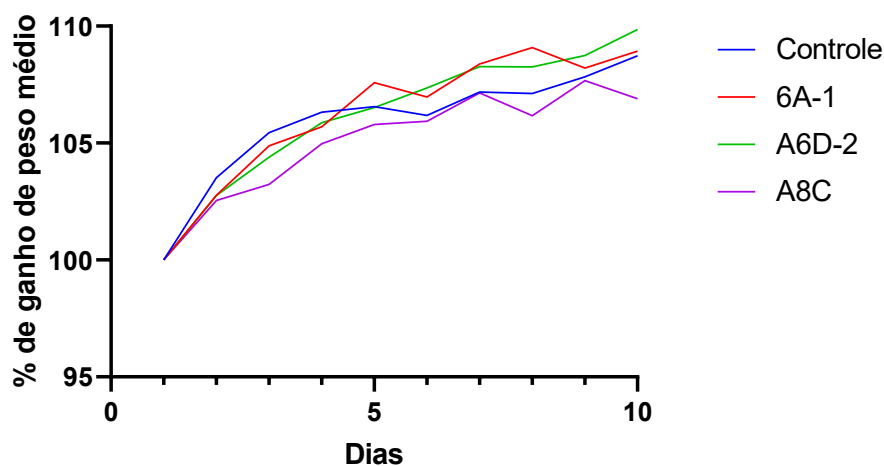


Figura 9: Percentual de ganho de peso anterior ao desafio com *Salmonella* Typhimurium. Acompanhamento do ganho de peso nos 10 primeiros dias do teste de potencial probiótico dos isolados.

No décimo dia todos os animais foram desafiados com *S. Typhimurium* e a mesma diluição fornecida aos animais foram crescidas em placas MacConkey e contadas após 24 horas obtendo $1,06 \times 10^8$ UFC/mL. Cada animal recebeu $100 \mu\text{L}$ recebendo 10^7 UFC. Após o desafio os animais foram observados até o 38º dia.

No 38º dia os grupos Controle e A8C obtiveram um percentual de sobrevivência de zero, enquanto os grupos 6 A1 e A6D-2 obtiveram 8,33% e 18,18% de sobrevivência respectivamente. A **Figura 10** mostra a curva de sobrevivência dos grupos testados.

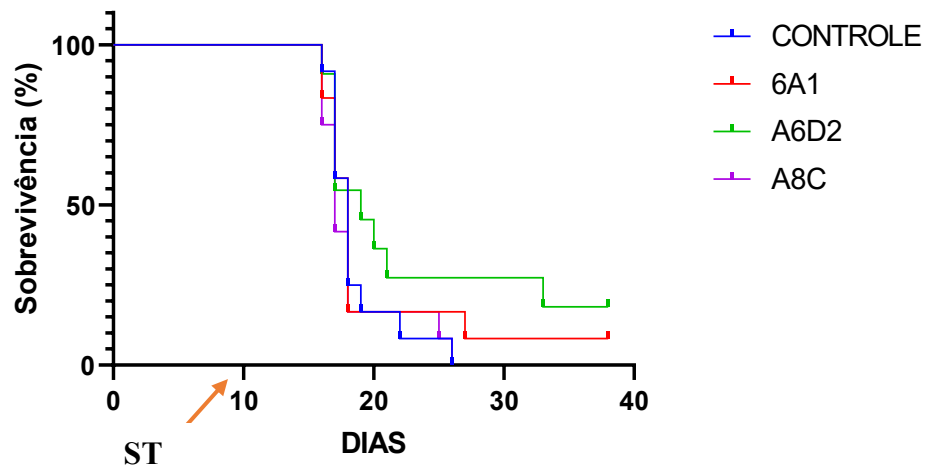


Figura 10: Sobrevivência após desafio com *Salmonella Typhimurium*. (ST) no 10º dia de tratamento recebendo, aproximadamente 10^7 UFC. 6 A1 $p = 0,6297$; A6D2 $p = 0,1676$ e A8C $p = 0,6293$ (*Log-rank, Mantel-Cox test*)

A mediana de sobrevivência ocorreu no 17º dia, onde em torno de 50% dos animais de cada grupo foram a óbito, não há diferença significativa entre as curvas de controle e tratamento.

5. DISCUSSÃO

O uso de probióticos para animais de companhia é recente, porém as evidências sugerem benefícios na promoção de saúde e prevenção de doenças, sendo uma abordagem promissora na modulação da microbiota do trato gastrointestinal (YANG & WU, 2023). A maioria das bactérias presente no intestino são anaeróbias estritas e os métodos tradicionais de cultivo em aerobiose e microaerofilia podem subestimar o número de microrganismos presente nas amostras de fezes (SUCHODOLSKI, 2022).

Após uma pré-seleção pela caracterização morfofisiológica, onde os isolados Gram positivo como morfologia de bacilo ou coco e catalase negativa foram selecionados, estes foram submetidos a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF. Foram identificados 34 isolados, tendo *Limosilactobacillus reuteri* como a espécie prevalente, perfazendo 70,59% dos isolados. *Limosilactobacillus reuteri* é uma espécie abundante presente na microbiota intestinal de mamíferos (SILVA et al., 2013). As espécies identificadas como o *Limosilactobacillus mucosae* e *Lactiplantibacillus plantarum* isolados nesse trabalho foram previamente descritas como parte da microbiota de felinos por outros autores (GRZEŚKOWIAK et al., 2015; LEE et al., 2022).

Os ensaios *in vitro* são uma triagem importante para a seleção de um potencial probiótico e uma abordagem relevante para selecionar os mais promissores para teste em modelos animais. Microrganismos com potencial probiótico devem cumprir critérios de seleção que incluem a tolerância a ácidos gástrico e sais biliares, habilidade de aderir a células do tecido epitelial, produção de substâncias antagônicas e evitar infecções, ser não patogênicos, não tóxicos e não invasivos, e não transmitirem horizontalmente genes de resistência a antimicrobianos (ALVIM et al., 2016; SILVA et al., 2013). A caracterização das propriedades funcionais *in vitro* foi realizada, observando-se o comportamento dos isolados quando submetidos ao suco gástrico artificial e aos sais biliares, e testados quanto à capacidade de hidrofobicidade da superfície celular, à produção de exopolissacarídeos, ao potencial de auto-agregação e co-agregação com patógenos, além do antagonismo contra bactérias patogênicas.

A viabilidade das células é um critério importante para a eficácia das bactérias do ácido láctico como probióticos. Ao entrar no trato gastrointestinal, os isolados devem ser capazes de resistir ao baixo pH estomacal e aos sais biliares. O efeito que o estresse causado pela redução do pH aos microrganismos ainda não foi completamente entendido, entretanto a acidificação

intracelular pode reduzir a atividade de enzimas ácido-sensíveis e causar danos nas proteínas e DNA. Já os sais biliares do hospedeiro podem exercer um efeito antimicrobiano, uma vez que as moléculas anfipáticas presente agem como detergentes na membrana dos microrganismos, enfraquecendo-as ou danificando-as (SILVA et al., 2013). A viabilidade das células dos isolados foram avaliadas após 2 horas de repouso em suco gástrico artificial. Dos isolados testados, 85,39% mostrou-se resistente ao suco gástrico artificial com pH 2,5. Estudos como os de Liang et al (2024) e Kim et al (2021) que isolaram bactérias lácticas de felinos, avaliaram a tolerância das mesmas em suco gástrico artificial com pH 2 e pH 3-4 respectivamente, e observaram alta tolerância dos isolados a redução drástica de pH. Telles et al. (2021) realizou um estudo caracterizando o pH em gatos saudáveis, usando um sistema de monitoramento contínuo e observou valores médio de pH gástrico para pré e pós alimentação de 2,7 e 2,0, sendo similar ao utilizado neste estudo.

Em geral, são considerados resistente a sais biliares, microrganismos que podem sobreviver na concentração de até 0,3% de sais biliares (LIANG et al., 2024; KIM et al., 2021). A viabilidade das células das amostras desafiadas com 0,3% de sais biliares foi acompanhada por 18 horas no leitor de ELISA onde, 20,50% das bactérias foram consideradas resistentes com o percentual de resistência entre 8,13 e 39,52%. Liang et al. (2024) e Kim et al. (2021) também avaliaram a tolerância dos isolados a sais biliares em concentrações que variaram de 0 a 0,6% de sais biliares (Oxgall), observando que a taxa de sobrevivência aumentava com a diminuição das concentrações de sais biliares.

Os probióticos, para obterem seus benefícios, são normalmente administrados via oral como organismos vivos (WANG et al., 2024). Uma estratégia interessante para preservar a viabilidade do probiótico durante estresses, como os provocados pela digestão, é a microencapsulação (RODRIGUES et al., 2020). Em seu estudo Rodrigues et al. (2020) avaliaram diferentes técnica de microencapsulação e constataram que a liofilização, especialmente com frutooligossacarídeos como agente encapsulante, foi mais eficaz em manter a viabilidade microbiana. Além disso, o co-encapsulamento com outras substâncias, como os prebióticos, tem se mostrado promissor, pois aumenta a eficácia do probiótico devido ao efeito sinérgico entre os componentes (GU et al., 2022).

As linhagens capazes de sobreviver e aderir ao revestimento intestinal podem colonizar o intestino e, posteriormente, liberar suas propriedades probióticas, enquanto as linhagens que

não conseguem são expelidas pelo hospedeiro. Além disso, podem competir com o patógeno pela colonização devido à forte adesão, exercendo um efeito antimicrobiano (WANG et al., 2024).

Como potenciais probióticos, os microrganismos identificados também devem apresentar características adequadas da superfície celular, além da capacidade de aderir às células superficiais do epitélio (STEINBERG et al., 2022). A natureza hidrofóbica da superfície celular dos microrganismos facilita a adesão às células epiteliais, conferindo-lhes vantagem na colonização do trato gastrointestinal. A hidrofobicidade está diretamente relacionada à habilidade das células de aderir a superfícies, sendo determinada pelos componentes hidrofóbicos presente no exterior da membrana dos microrganismos (SILVA et al., 2013). O percentual de hidrofobicidade auxilia na previsão do potencial de adesão das linhagens à superfície hidrofóbica das células epiteliais ou à natureza hidrofílica do muco em alguns tratos específicos (NADER-MACÍAS et al., 2008). Entretanto, embora contribua para a adesão, a hidrofobicidade não é um pré-requisito para uma forte adesão as células intestinais, como demonstrado por Todorov; LeBlanc e Franco (2012).

No estudo de Nader-Macías et al. (2008), lactobacilos isolados de bovinos foram avaliados quanto à hidrofobicidade pelo ensaio de adesão microbiana a hidrocarbonetos, revelando que a maioria das linhagens (80-90%) apresentava baixa hidrofobicidade ($\leq 33\%$). De forma semelhante, no presente estudo, 32 (94%) dos isolados foram considerados pouco hidrofóbicos, quando avaliados pelo MATS, com valores inferiores a 33%. Apesar dessa baixa hidrofobicidade, linhagens de bactérias do ácido lático (BAL) ainda podem formar auto-agregados e aderir por meio de interações hidrofílicas, o que pode ser explicado pela presença de glicoproteínas ou peptídeos glicosilados (STEINBERG et al., 2022).

O Exopolissacarídeo são polímeros extracelulares que podem ser produzidos por BAL durante a fermentação de carboidratos, sendo um dos principais componentes do biofilme microbiano, podendo também contribuir na persistência durante a colonização do trato gastrointestinal (OLIVEIRA et al., 2020; PAIVA et al., 2016). Ao realizar a substituição de glicose por sacarose ou lactose para avaliar se há produção de EPS, nove dos 34 isolados cresceram nestes meios modificados, entretanto, não foi observado produção de EPS. Os outros 25 (73,53%) isolados não foi observado crescimento nos meios com alterações. Apesar da produção de EPS estar diretamente relacionada à formação de biofilmes, Steinberg et al. (2022)

não observaram essa tendência em linhagens de BAL isoladas de bovinos. Os autores sugerem que um resultado positivo para a produção de EPS não implica, necessariamente, que a linhagem seja grande produtora de biofilme, e que outras proteínas como as proteínas ESP e BAP, seriam mais significativas (STEINBERG et al., 2022; TOLEDO-ARANA et al., 2001).

A adesão as células epiteliais e fenômenos como auto-agregação e co-agregação contribuem para a formação e estabilidade de biofilmes na mucosa (OCAÑA & NADER-MACÍAS, 2002). Auto-agregação é a capacidade dos microrganismos formarem aglomerados com outro da mesma linhagem em uma suspensão, enquanto a co-agregação é a capacidade dos microrganismos agregarem com outros geneticamente diferente em uma suspensão (WANG et al., 2024; STEINBERG et al., 2022). A maioria dos isolados obtidos aqui neste estudo (73,53%) apresentou baixo potencial de auto-agregação, com os percentuais variando de 13,95 a 42,30%. Esse resultado foi observado após as suspensões permanecerem em repouso por 2 horas à temperatura ambiente. NADER-MACÍAS et al., (2008) observaram resultado semelhante em isolados de BAL, nos quais 92% apresentaram baixo potencial de auto-agregação após as suspensões ficarem 2 horas de repouso. De forma semelhante, Steinberg et al., (2022), ao analisarem isolados de vacas, constataram que metade dos isolados apresentou baixa auto-agregação após as suspensões ficarem em repouso por 4 horas. Por sua vez, Wang et al., (2024), após incubação por 6 horas a 37°C obteve um potencial de auto-agregação com valores que variaram entre 36 e 88%.

Para o ensaio de co-agregação foram utilizadas bactérias comuns em enteropatias, sendo observado em sua grande maioria um percentual médio (33% - 66%) de co-agregação. O percentual médio de co-agregação dos 34 isolados com *S. Typhimurium* foi de 35,33% variando entre 14,92 e 57,30%. Enquanto o percentual médio para *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. faecalis* foi de 44,14%, 46,47% e 26,34% respectivamente. Para *P. aeruginosa* foi observado o maior percentual médio de co-agregação sendo de 49,80% e variando entre 32,57 e 69 %. A capacidade de adesão de um microrganismo é um processo complexo de várias etapas que pode envolver tanto mecanismos inespecíficos quanto interações específicas entre receptores e ligantes (DEL RE et al., 2000). A caracterização das propriedades de auto-agregação e co-agregação contribui para compreender o papel desses fenômenos na formação de biofilmes e no efeito protetor dos lactobacilos na mucosa, sendo esse efeito associado na manutenção de populações microbianas estáveis nas superfícies teciduais (OSCAÑA & NADER-MACÍAS, 2002) e na prevenção da colonização de patógenos intestinais (WANG et al., 2024).

As BAL vêm se mostrando uma alternativa promissora para o uso de antibióticos no combate a infecções por patógenos (WANG et al., 2024). Este estudo avaliou a capacidade antibacteriana das linhagens isoladas contra cinco patógenos comuns em infecções gastrointestinais, sendo estes os mesmos utilizados para o ensaio de co-agregação. Apenas um isolado não apresentou nenhuma atividade antagonista com pelo menos um dos patógenos testados. Dos 34 isolados, 26 (76,47%) demonstraram atividade antagônica contra *Pseudomonas aeruginosa*, sendo este o patógeno com maior número de isolados ativos. Em relação à *Salmonella Typhimurium*, 20 (64,70%) apresentaram algum grau de antagonismo.

A capacidade de inibir crescimento de outros microrganismos provavelmente se deve a produção de substâncias antimicrobianas difusíveis como ácidos orgânicos, peróxido hidrogênio ou bacteriocinas (STEINBERG et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2020). Nader-Macías et al. (2008) observaram, em um estudo com isolados de BAL com potencial probiótico obtidos do trato vaginal e glândula mamária de novilhas adultas, bem como das fezes e cavidade oral de bezerros recém-nascidos, que a produção de ácidos orgânicos foi o principal responsável pela inibição de patógenos nos tratos vaginal e digestivo. Além disso, identificaram uma linhagem capaz de produzir uma substância inibitória caracterizada como bacteriocina, com atividade contra *Listeria ssp*. A produção de substâncias inibitórias pode contribuir para o efeito antagônico contra patógenos em locais específicos de ação (NADER-MACÍAS et al., 2008).

Dez linhagens isoladas foram consideradas promissoras candidatas a probióticos após análise das características funcionais, sendo sete *Limosilactobacillus reuteri*, um *Lactiplantibacillus plantarum*, um *Limosilactobacillus mucosae* e um *Enterococcus hirae*. Para serem usadas como probióticos, as linhagens devem ser avaliadas quanto a possível presença de características de virulência, avaliando os possíveis riscos durante o consumo (FADDA et al, 2017).

A produção de gelatinase e hemolisina são indicativos de patogenicidade que estão sendo usados para avaliar a segurança do consumo de linhagens com potencial probiótico. A presença destes compostos extracelulares pode causar danos e degeneração das células hospedeiras o que facilitaria a invasão do hospedeiro e disseminação do microrganismo por tecidos e órgãos (OLIVEIRA et al, 2020). Nos isolados testados, não foram observados a atividade destas enzimas.

O perfil de resistência a antibióticos também foi avaliado neste estudo como fator de segurança. Com o aumento da resistência a antibióticos, fica cada vez mais difícil tratar doenças infecciosas comuns, devido à baixa efetividade dos antibióticos causada pelo surgimento de novos mecanismos de resistência (VIEIRA et al., 2023). O antibiograma é um critério importante para avaliar o risco de transferência lateral de genes de resistência para comensais e patógenos pertencentes à microbiota indígena (STEINBERG et al., 2022; SILVA et al., 2013). Para este estudo, foram utilizados antibióticos de uso comum na clínica humana e de uso na clínica veterinária de felinos. Os isolados foram sensíveis a pelo menos 6 dos 10 antibióticos testados, e os pontos de corte foram sugeridos por CHARTERIS et al. (1998), ANVISA (2005) e CLSI (2020). Para as fluoroquinolonas utilizadas, Enrofloxacina e Marbofloxacina, não há halo de inibição definidos nas tabelas de referência. Dos 34 isolados testados, apenas um formou halo de inibição para Marbofloxacina e quatro para Enrofloxacina, todos com tamanhos inferiores a 14 mm. No grupo das fluoroquinolonas, o maior diâmetro para ser considerado resistente está entre 12 e 18 mm, o que sugere que os cinco isolados citados sejam resistentes a esses antibióticos.

As BAL são normalmente reconhecidas como bactérias de uso seguro pela Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) (KIM et al., 2021) e esses resultados mostram que todos os dez isolados selecionados e testados podem ser considerados seguros. RUDENKO et al. (2021), em seus experimentos de prospecção de linhagens em felinos saudáveis, observaram que as culturas experimentais de lactobacilos apresentaram um alto grau de resistência à gentamicina, lincomicina e enrofloxacina. A exposição contínua dessas bactérias ao ambiente, pode não apenas torná-las resistente, mas transferir o fator de resistência para outras bactérias patogênicas por meio da transferência horizontal de genes (KIM et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020).

Embora o uso de antibióticos possa comprometer a ação dos probióticos, a resistência a antibiótico pode ser uma característica vantajosa em probióticos utilizados no tratamento de disbiose causada pelo consumo desses medicamentos, pois permitiria que o probiótico sobrevivesse e exercesse sua função mesmo durante o tratamento antibiótico (KIM et al., 2021). O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos é considerado pela ANVISA um dos testes essenciais para a comprovação de segurança de uma linhagem. As linhagens candidatas a probióticos devem ser avaliadas em relação a um número relevante de antimicrobianos de importância humana e veterinária e devem ser susceptíveis a pelo menos dois antibióticos

cl clinicamente relevantes, para garantir que haja tratamento disponível em caso de infecções (ANVISA, 2021), dessa forma, este estudo está em conformidade como as recomendações da ANVISA para susceptibilidade antimicrobianos.

Com base na avaliação das características funcionais e de segurança, três linhagens foram selecionadas para verificar se as propriedades observadas *in vitro* também são visíveis *in vivo*. As linhagens de BAL selecionadas - *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1, *Limosilactobacillus reuteri* - A6D2 e *Limosilactobacillus mucosae* – A8C - foram avaliadas quanto à capacidade de proteger animais durante uma infecção por *S. Typhimurium*.

Neste estudo observou-se o ganho de peso nos animais tratados com os isolados em comparação aqueles tratados apenas com solução salina antes do desafio com *S. Typhimurium*. Observou-se que os animais tratados com *Limosilactobacillus reuteri* -A6D2 apresentaram um ganho de peso 16% maior em comparação com os animais controle, seguido do *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 onde ganho de peso foi 4% superior. A administração oral de *Limosilactobacillus mucosae* – A8C resultou em ganho de peso 20% inferior ao controle. Apesar de não haver diferença significativa entre as curvas, o aumento de peso refletiu na sobrevivência dos camundongos após o desafio com *S. Typhimurium*, onde os grupos tratados com *Limosilactobacillus reuteri* – A6D2 e *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 tiveram um percentual de sobrevivência de 18,18 e 8,33%, enquanto o grupo controle e o grupo tratado com *Limosilactobacillus mucosae* -A8C não houve sobrevivente.

Bujalance et al. (2014) realizaram um estudo de infecção experimental por *Salmonella Typhimurium*, no qual os animais receberam um pré-tratamento de 6 dias com BAL antes da infecção, sem observar efeito significativo sobre a infecção pelo enteropatógeno. No entanto, ao aumentar o período de pré-tratamento para 20 dias, foi observado um certo grau de proteção contra *Salmonella*. Abatamarco Júnior et al. (2018) também observaram maior ganho de peso corporal e sobrevida em animais que receberam pré-tratamento com BAL durante dez dias anterior a infecção por *Salmonella* em comparação com aqueles que não receberam. O ganho de peso observado nos animais tratados *Limosilactobacillus reuteri* – A6D2 e *Lactiplantibacillus plantarum* – 6A1 em comparação aos animais controles sugere que estas são seguras e não interferem negativamente na saúde dos animais. Indicando que o tratamento com o probiótico não causou efeitos adversos significativos, demonstrando a segurança destas linhagens.

Um fator que pode ter influenciado a baixa sobrevivência dos animais após o desafio com o patógeno, observada neste estudo, pode ter sido a dose de *Salmonella* inoculada nos animais. Embora se esperasse que os animais recebessem 10^6 UFC de *S. Typhimurium*, a contagem realizada após plaqueamento da suspensão em ágar MacConkey, indicou que a dose foi 10^7 UFC, ou seja, 10 vezes mais do que a quantidade de *Salmonella* recomendada para o desafio. Zacarias et al. (2014) desafiaram camundongos machos de seis semanas com doses únicas de 10^4 , 10^5 ou 10^6 UFC de *Salmonella Typhimurium* e observaram uma sobrevivência de 90, 70 e 50%, respectivamente. Indicando que a dose excessiva utilizada pode ter contribuído para a alta mortalidade observada, o que reforça a necessidade de repetir o ensaio com ajuste da dose. Além de observar o efeito protetor das linhagens, o modelo murino também permite investigar alterações nos órgãos decorrentes da infecção por *S. Typhimurium*, bem como quantificar as alterações na expressão gênica de citocinas no intestino delgado (ALVIM et al., 2016), justificando a continuidade dos estudos com esse modelo para avaliar a capacidade das linhagens proteger durante a infecção por *Salmonella*.

6. CONCLUSÃO

O uso de probiótico em animais de companhia é uma abordagem promissora na modulação do trato gastrointestinal. Este trabalho identificou e caracterizou 34 cepas de bactérias do ácido láctico de amostras de fezes e cavidade oral de filhotes de gatos, sendo submetidos a teste de fenotípicos e fisiológicos a fim de identificar características desejáveis para probióticos. De maneira geral, os isolados conseguiram cumprir os critérios de seleção, demonstrando resistência a passagem pelo trato gastrointestinal simulado pelo suco gástrico artificial e sais biliares, além de apresentarem propriedades hidrofílicas, com potencial de auto-agregação e co-agregação médio. Trinta e três linhagens apresentaram atividade antagônica contra os patógenos testados. Após essa triagem dez isolados foram selecionados e avaliados quanto aos parâmetros de segurança para garantir um uso seguro, apresentando resultados satisfatórios, sem produção de gelatinase e hemolisina, e sendo sensíveis a maioria dos antibióticos testados no antibiograma.

Após a caracterização *in vitro* três linhagens, *Lactiplantibacillus. Plantarum* – 6A1, *Limosilactobacillus. reuteri* – A6D2 e *Limosilactobacillus. mucosae* – A8C, foram selecionadas com base em suas propriedades probióticas promissoras, sem características prejudiciais, para teste *in vivo*. Esses resultados demonstram que os isolados se mostram promissoras com características desejáveis como possíveis probióticos sendo necessário mais estudos para avaliar melhor a capacidade de proteção dessas linhagens.

REFERÊNCIAS

- ABATEMARCO JÚNIOR, M.; SANDES, S. H. C.; RICCI, M. F.; ARANTES, R. M. E.; NUNES, Á. C.; NICOLI, J. R.; & NEUMANN, E. Protective Effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, Isolated From Brazilian Kefir, Against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Experimental Murine Models. **Frontiers in Microbiology**, 9:2856; Dec 2018.
- AINDELIS, G.; TIPTIRI-KOURPETI, A.; LAMPRI, E.; SPYRIDOPOULOU, K.; LAMPRIANIDOU, E.; KOTSIANIDIS, I.; YPSILANTIS, P.; PAPPAS, A.; CHLICHLIA, K. Immune Responses Raised in an Experimental Colon Carcinoma Model Following Oral Administration of *Lactobacillus casei*. **Cancers**; v. 12, p. 368, Feb 2020.
- ALVIM, L.B.; SANDES, S.H.; SILVA, B.C.; STEINBERG, R.S.; CAMPOS, M.H.; ACURCIO, L.B.; ARANTES, R.M.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. **Benef Microbes**; 7(1):61-73, Feb 2016.
- ANATRIELLO, E.; CUNHA, M.; NOGUEIRA, J.; CARVALHO, J.L.; SÁ, A.K.; MIRANDA, M.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; KELLER, A.C.; AIMBIRE, F. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet. **Cellular Immunology**; v. 341, Jul 2019.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. Guia nº 21/2021 – versão 2. Brasília, 2021.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo, v. 25, n. 1, p. 55-58, 2005
- BORTOLAIA, V.; ESPINOSA-GONGORA, C.; GUARDABASSI, L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. **Clin Microbiol Infect.** 22(2):130-140; Feb 2016.
- BUJALANCE, C.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; RUIZ-LÓPEZ, M.-D.; LASSERROT, A. & RUIZ-BRAVO, A. (2014). Lack of correlation between *in vitro* antibiosis and *in vivo* protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. **Research in Microbiology**, 165(1), 14–20; Jan 2014.
- CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- DANG, F.; JIANG, Y.; PAN, R.; ZHOU, Y.; WU, S.; WANG, R.; ZHUANG, K.; LI, T.; ZHANG, W.; MAN, C. Administration of *Lactobacillus paracasei* ameliorates type 2 diabetes in mice. **Food Funct.** v. 7, Jun 2018.

DEFELIPE, R.; SAVALLI, C.; OTTA, E. Demographics and self-reported well-being of Brazilian adults as a function of pet ownership: A pilot study. **Heliyon**; 20;6(6):e04069, Jun 2020.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Lett Appl Microbiol**. 31(6):438-42; Dec 2000.

FADDA, M.E.; MOSSA, V.; DEPLANO, M.; PISANO, M.B.; COSENTINO, S. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT - Food Science and Technology**; 75, 100–106, 2017.

FELIPETTO, L.G.; FERNANDES, F.D.; VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; BOTTON, S.A.; SANGIONI, L.A. Demographics and health care profiles of dogs and cats associated with the socioeconomic profile of their tutors in areas assisted by Family Health Strategies in Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**; 74(6):1007–16, Nov 2022.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO/WHO), 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional Properties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria. 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina.

GRZEŚKOWIAK, Ł.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**; 34:14-23, Aug 2015.

GU, Q.; YIN, Y.; YAN, X.; LIU, X.; LIU, F.; MCCLEMENTS, D.J. Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutraceuticals for improved health effects: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**; v. 309; Nov 2022.

HALLORAN, K.; UNDERWOOD, M.A. Probiotic mechanisms of action. **Early Human Development**; 135, 58–65, Aug 2019.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**; 11(8), 506–514, Aug 2014.

KIM, K.T.; KIM, J.W.; KIM, S.I.; KIM, S.; NGUYEN, T.H.; KANG, C.H. Antioxidant and anti-inflammatory effect and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from canine and feline feces. **Microorganisms**; 9, 1971, 2021.

LEE, D.; GOH, T.W.; KANG, M.G.; CHOI, H.J.; YEO, S.Y.; YANG, J.; HUH, C.S.; KIM, Y.Y.; KIM, Y. Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. **J Anim Sci Technol**; 64(2):197-217, Mar 2022.

LIANG, S.; KANG, Y.; ZHAO, Y.; SUN, J.; WANG, X.; TAO, H.; WANG, Z.; WANG, J.; ZHONG, Y.; HAN, B. Characterization and potential lipid-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from cats. **Front. Microbiol**; 15:1392864, Apr 2024.

LYU, Y.; SU, C.; VERBRUGGHE, A.; VAN DE WIELE, T.; MARTOS MARTINEZ-CAJA, A.; HESTA, M. Past, present, and future of gastrointestinal microbiota research in cats. **Front. Microbiol**; 11:1661, Jul 2020.

MAZZIOTTA, C.; TOGNON, M.; MARTINI, F.; TORREGGIANI, E.; ROTONDO, J.C. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human **Health. Cells**; 12(1), 184, Jan 2023.

NADER-MACÍAS, M.E.F.; OTERO, M.C.; ESPECHE, M.C.; MALDONADO, N.C. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**; 35(11), 1387–1395, Nov 2008.

OCAÑA, V.S.; NADER-MACÍAS, M.E. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. **British Journal of Biomedical Science**; 59(4):183-90, Mar 2002.

OLIVEIRA, S. R. M.; COSTA, K.; UETANABARO, A.P.T.; NEUMANN, E.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R. *In vitro* selection and *in vivo* trial of *Lactobacillus* strains for use as a potential probiotics for laying hens. **International Journal Of Veterinary Science & Technology**; v. 4, p. 34-42, Sep 2020.

PAIVA, I. M. *et al.* *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 390–398, 2016.

PLAZA-DIAZ J.; RUIZ-OJEDA F.J.; GIL-CAMPOS M.; GIL A. Mechanisms of action of probiotics. **Adv Nutr**, v. 10 (suppl_1):S49-S66, 2019. Erratum in: **Adv Nutr**, 11(4):1054, 2020.

RODRIGUES, B.M.; OLIVO, P.M.; OSMARI, M.P.; VASCONCELLOS, R.S.; RIBEIRO, L.B.; BANKUTI, F.I.; POZZA, M.S.S. Microencapsulation of Probiotic Strains by Lyophilization Is Efficient in Maintaining the Viability of Microorganisms and Modulation of Fecal Microbiota in Cats. **Int J Microbiol**. 30;2020:1293481; Jul 2020.

RUDENKO, P.; VATNIKOV, Y.; SACHIVKINA, N.; RUDENKO, A.; KULIKOV, E.; LUTSAY, V.; NOTINA, E.; BYKOVA, I.; PETROV, A.; DRUKOVSKIY, S.; et al. Search for promising strains of probiotic microbiota isolated from different biotopes of healthy cats for use in the control of surgical infections. **Pathogens**, 10, 667, 2021

SANTOS, T.T.; ORNELLAS, R.M.D.S.; ACURCIO, L.B.; SANDES, S.H.C.; DA COSTA, A.M.; UETANABARO, A.P.T.; NICOLI, J.R.; VINDEROLA, G. Differential immune response of *Lactobacillus plantarum* 286 Against *Salmonella* Typhimurium infection in conventional and germ-free mice. **Adv Exp Med Biol**; 1323:1-17, 2021.

SCORESBY, K.J.; STRAND, E.B.; NG, Z.; BROWN, K.C.; STILZ, C.R.; STROBEL, K.; BARROSO, C.S.; SOUZA, M. Pet ownership and quality of life: A systematic review of the literature. **Vet. Sci**. 8, 332; Dec 2021.

SILVA, B.C.; JUNG, L.R.; SANDES, S.H.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Benef Microbes**; 4(3):267-75, 2023.

STEINBERG, R.S.; SILVA, L.C.S.E.; DE SOUZA, M.R. *et al.* Prospecting of potentially probiotic lactic acid bacteria from bovine mammary ecosystem: imminent partners from bacteriotherapy against bovine mastitis. **Int Microbiol**; 25(1):189-206, 2022.

SUCHODOLSKI, J.S. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. **Vet Clin Pathol**; 50 Suppl 1(Suppl 1):6-17, 2022.

TELLES, N.J.; SIMON, B.T.; SCALLAN, E.M.; GOULD, E.N.; PAPICH, M.G.; HE, Y.; LEE, M.T.; LIDBURY, J.A.; STEINER, J.M.; KATHRANI, A.; KATHERINE TOLBERT, M. Evaluation of gastrointestinal transit times and pH in healthy cats using a continuous pH monitoring system. **J Feline Med Surg**; 24(10):954-961, Oct 2022.

TODOROV, S.D.; LEBLANC, J.G.; FRANCO, B.D. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **World J Microbiol Biotechnol**; 28:973–984; 2012.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADES, J.R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol** 67(10):4538–4545; 2001.

VIEIRA, A.C. A. *et al.* *In vitro* evaluation of probiotic and technological properties of lactic acid bacteria isolated from artisanal cheese produced in the Serra Geral - Minas Gerais - Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, n. 3, p. 535–543, maio 2023.

WANG, J.; YANG, X.; PENG, Y.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; ZHONG, Z.; LIU, H.; FU, H.; ZHOU, Z.; PENG, G. Isolation and *in vitro* investigation on lactic acid bacteria for potential probiotic properties from cat feces. **Front. Vet. Sci.** 11:1495745, 2024.

YANG, Q.; WU, Z. Gut Probiotics and Health of Dogs and Cats: Benefits, Applications, and Underlying Mechanisms. **Microorganisms**, 11, 2452, 2023.

YUE, Y. HE, Z.; ZHOU, Y.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; YANG, B.; CHEN, W. *Lactobacillus plantarum* relieves diarrhea caused by enterotoxin-producing *Escherichia coli* through inflammation modulation and gut microbiota regulation. **Food & Function**, 11(12), 10362–10374, Nov 2020.

ZACARÍAS, M.F.; REINHEIMER, J.; FORZANI, L.; GRANGETTE, C.; VINDEROLA, G. (2014) Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Benef Microbes** 5:427–436, Mar, 2014.

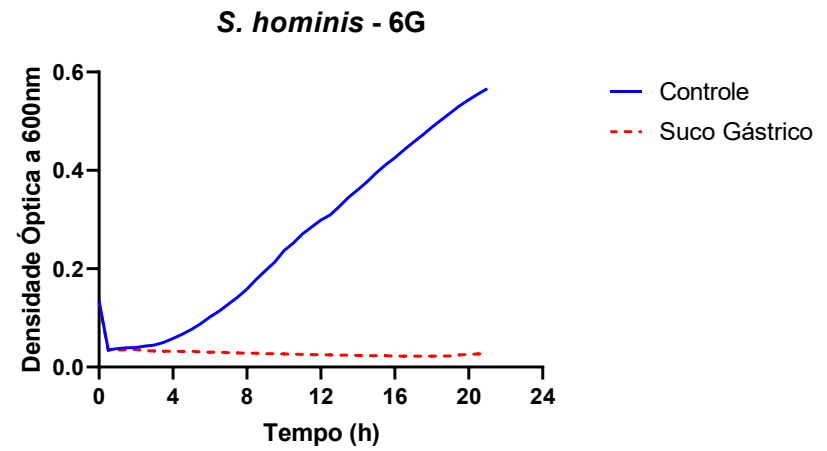
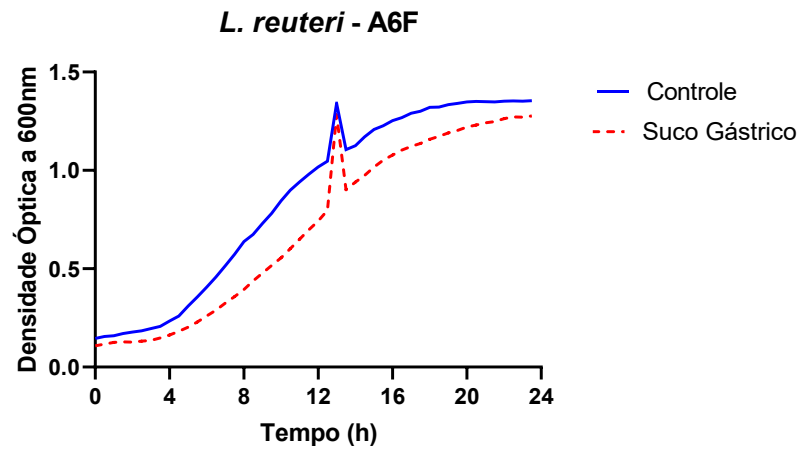
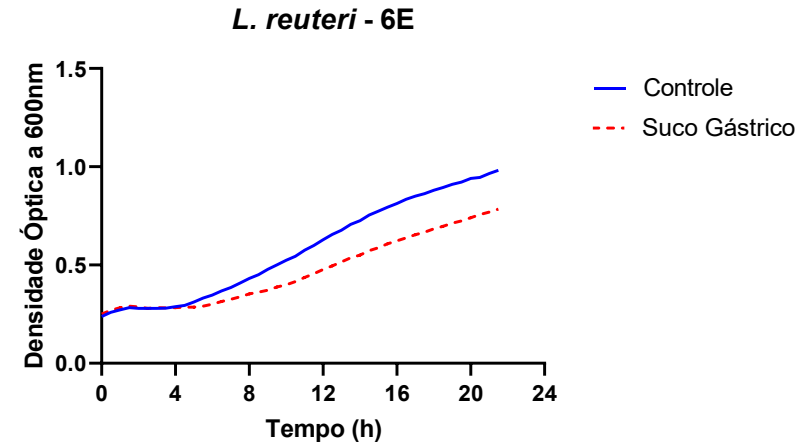
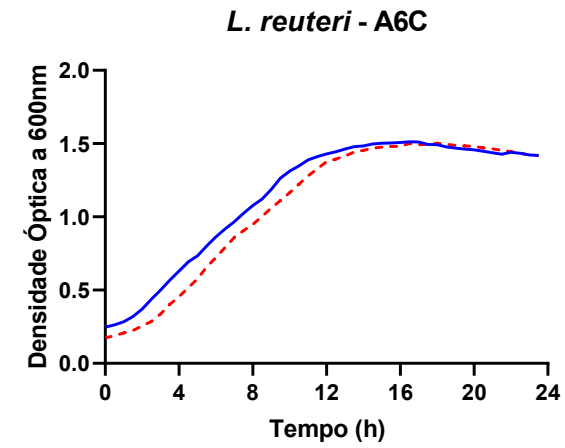
ZANIRATI, D. F. *et al.* Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, 32, p. 70-76, 2015.

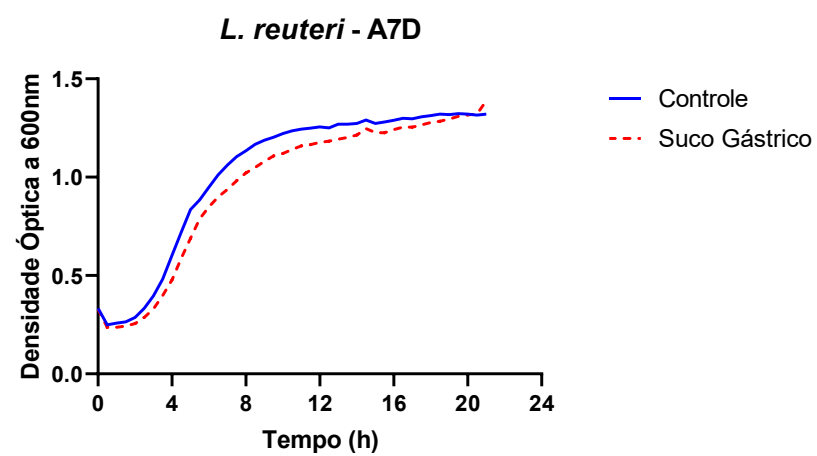
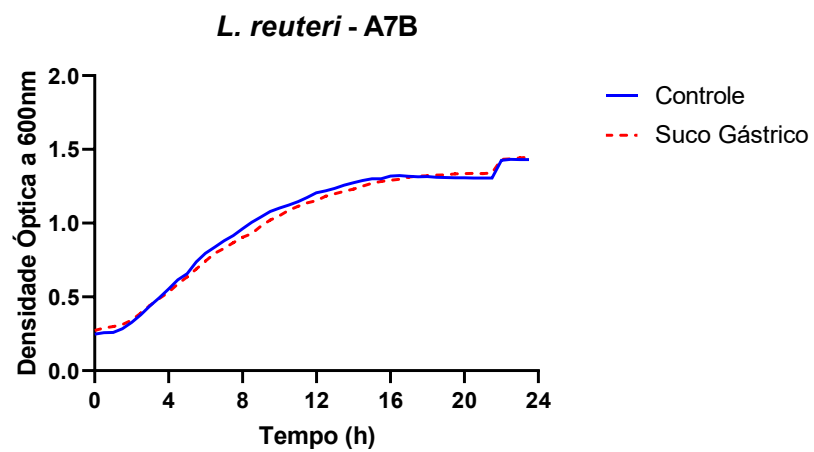
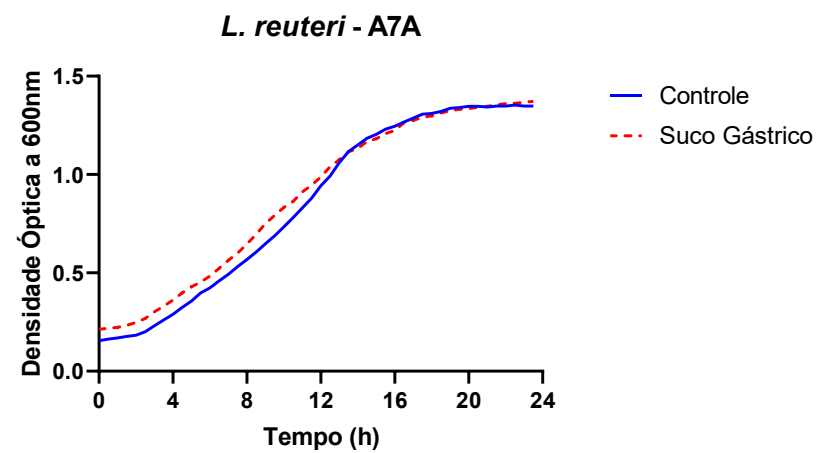
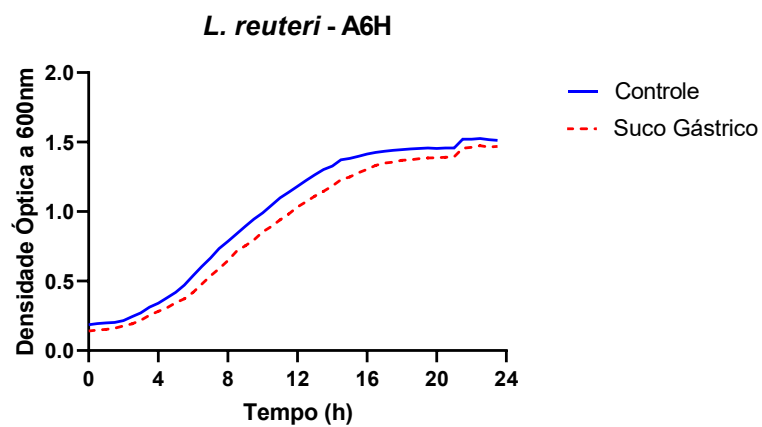
ZHA, M.; ZHU, S.; CHEN, Y. Probiotics and cat health: A Review of progress and prospects. **Microorganisms**, 12, 1080, 2024.

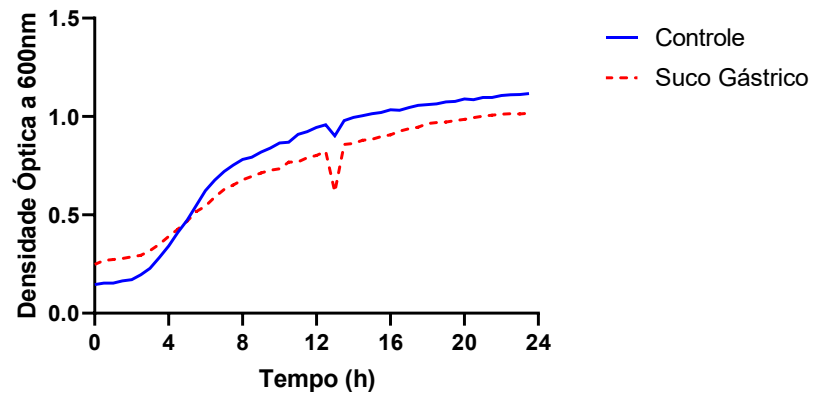
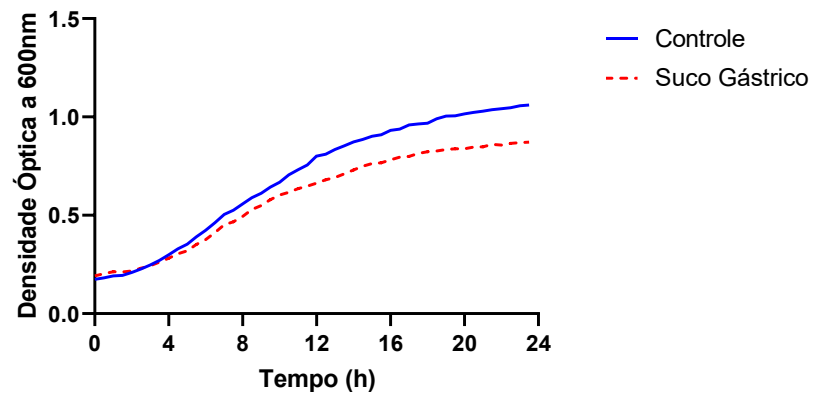
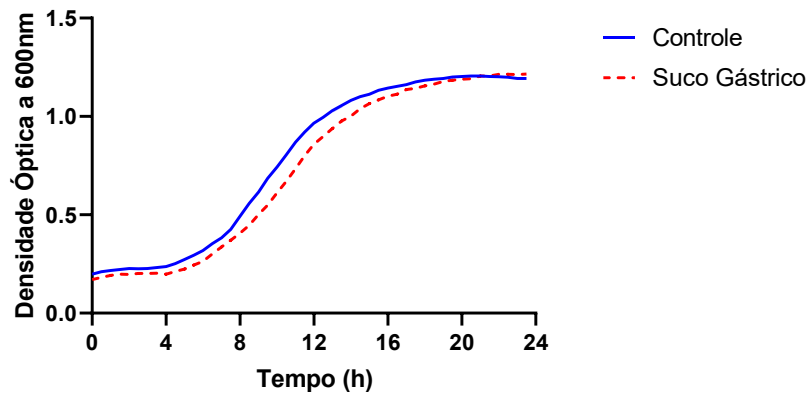
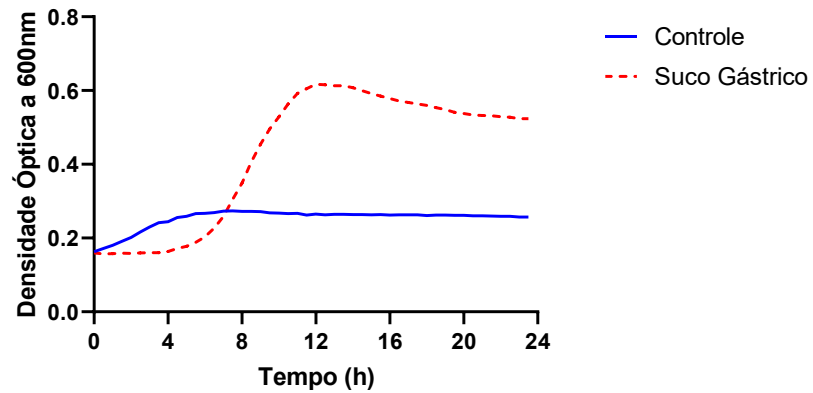
ZIESE, A.L.; SUCHODOLSKI, J.S. Impact of changes in gastrointestinal microbiota in canine and feline digestive diseases. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**; 51(1):155-169, Jan 2021.

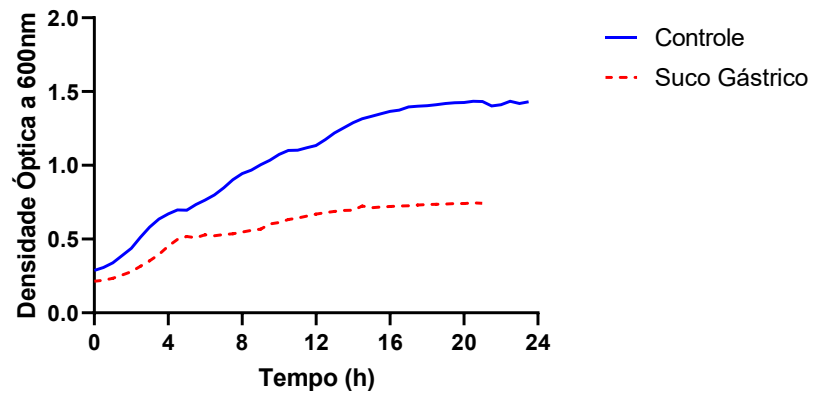
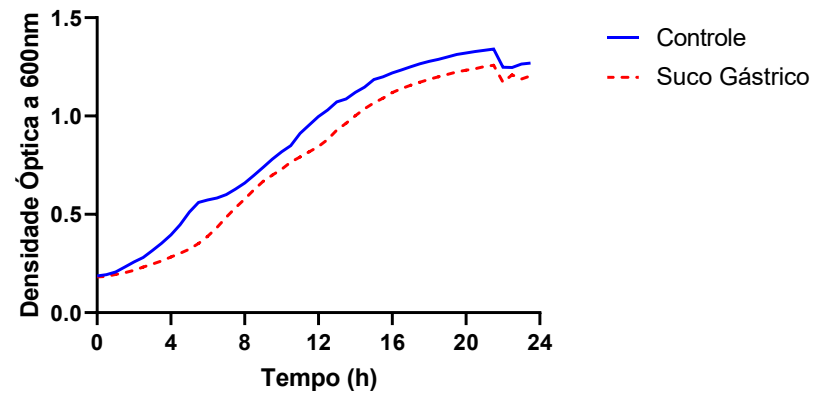
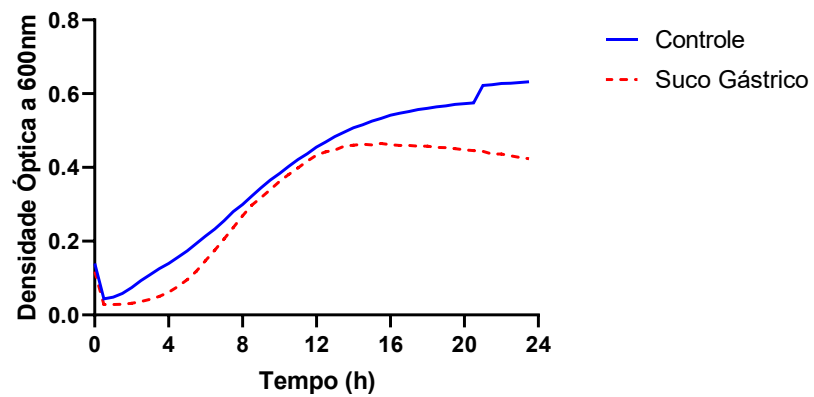
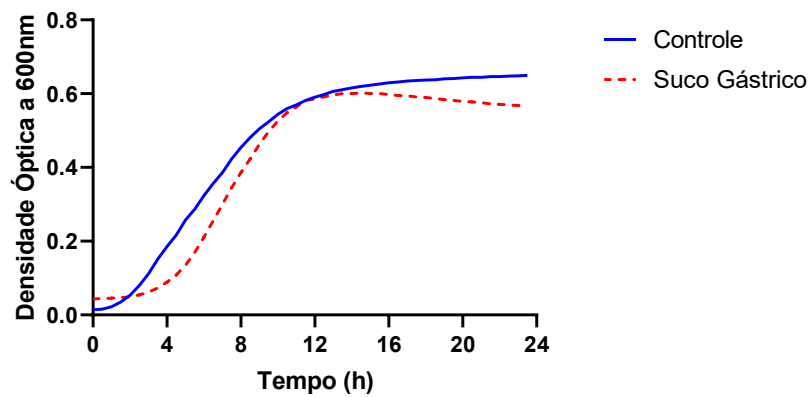
APÊNDICES

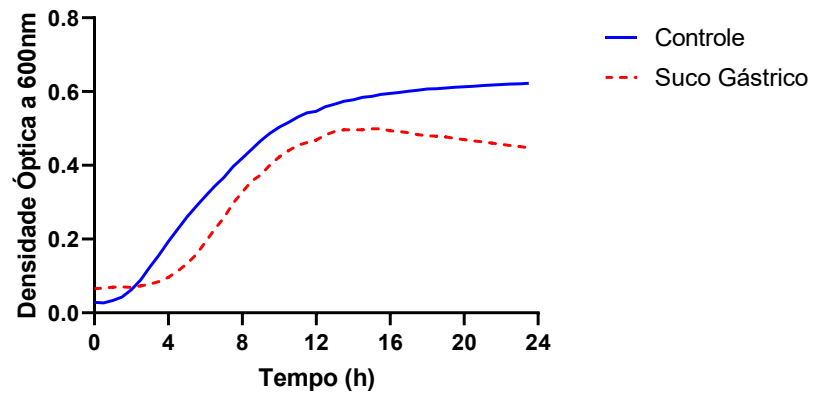
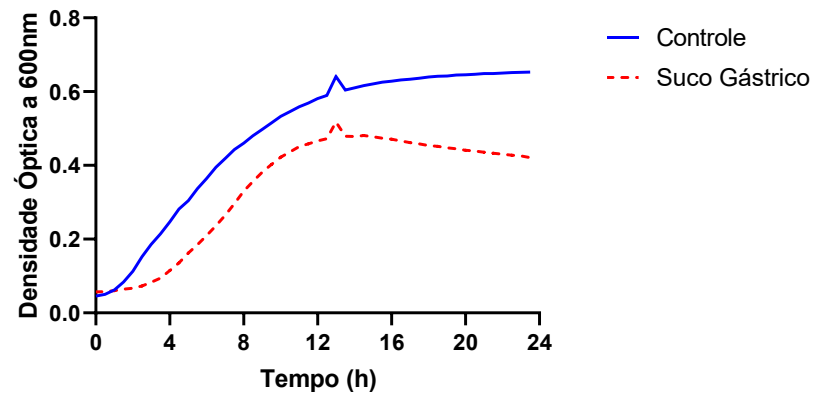
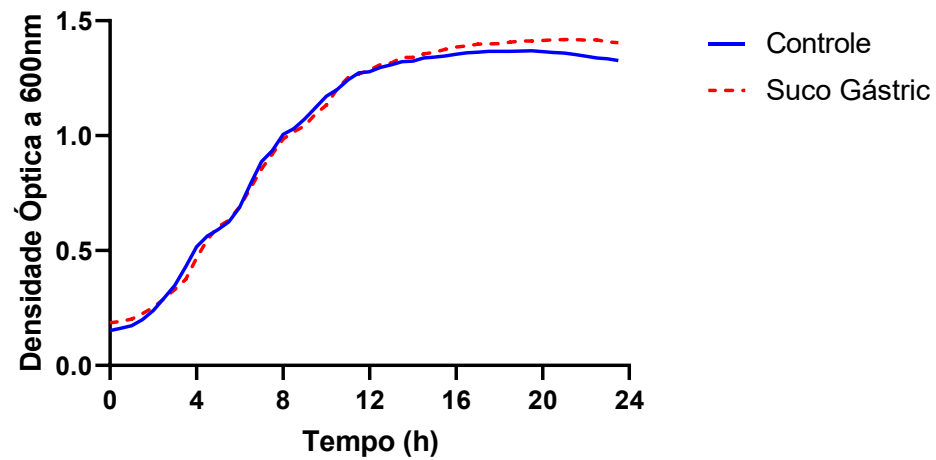
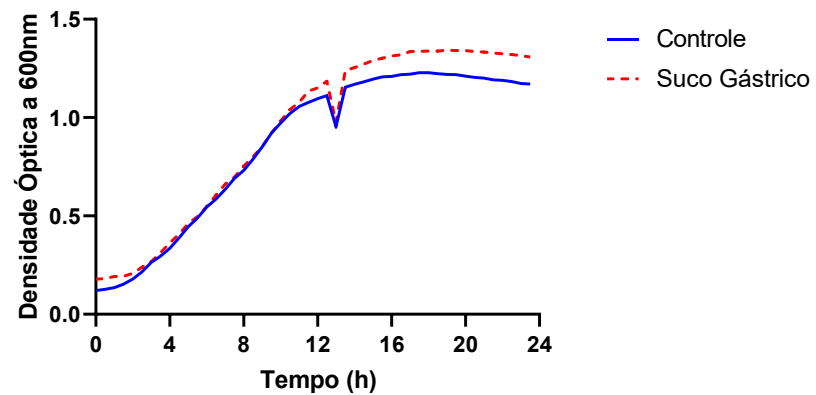
Apêndice A - Curvas de crescimento dos isolados na presença e ausência de suco gástrico artificial.

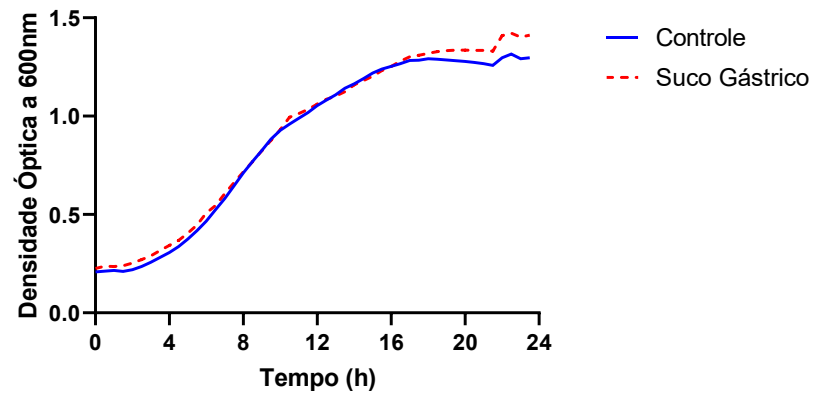
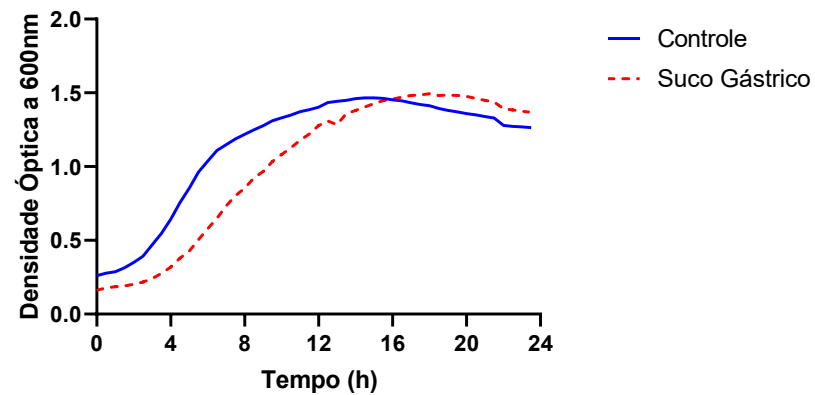
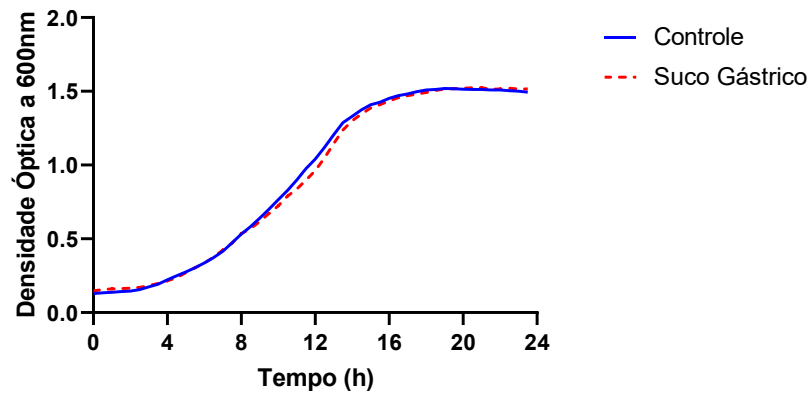
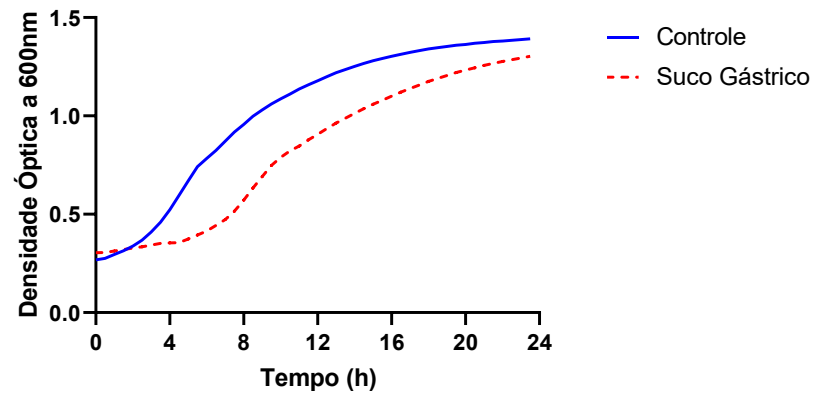


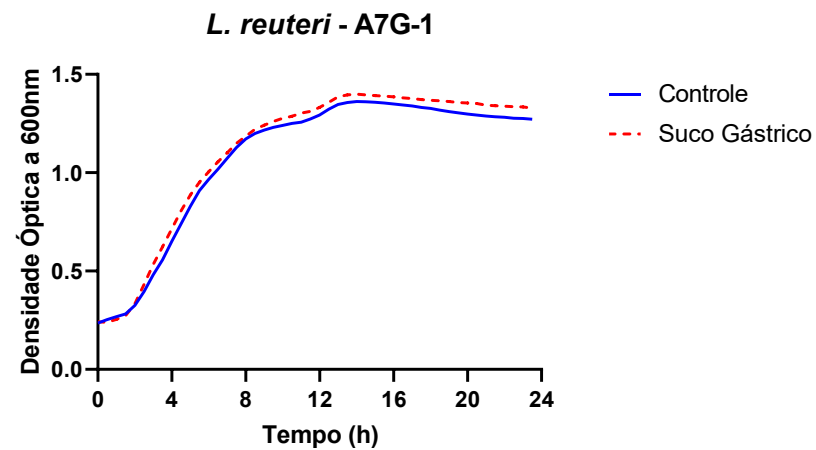
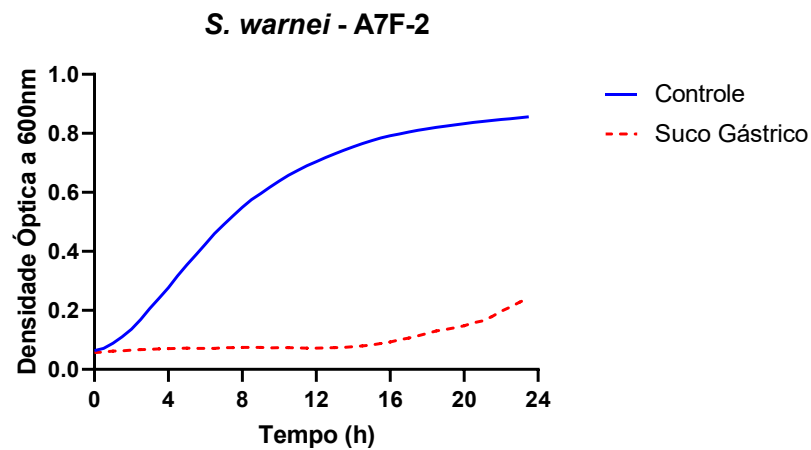
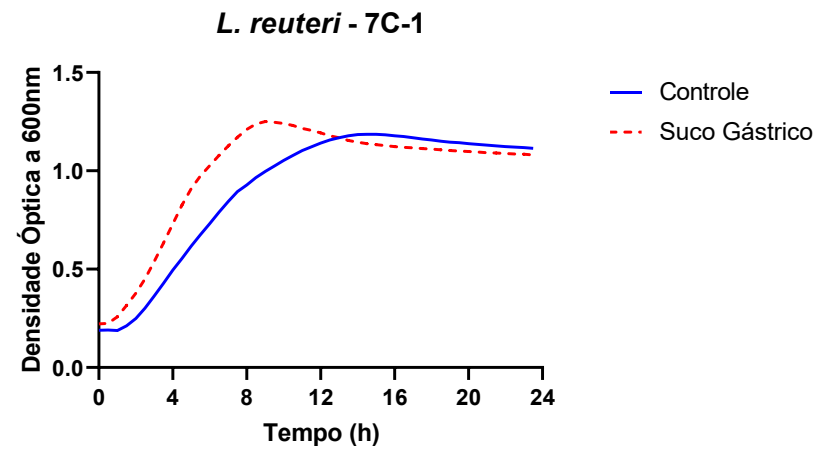
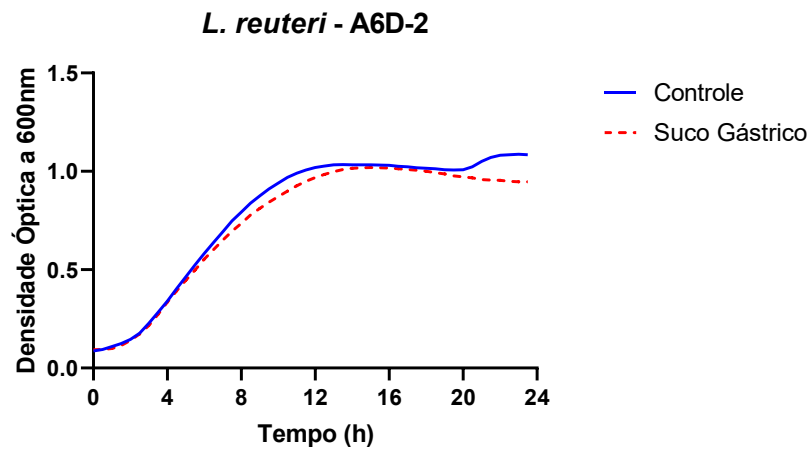


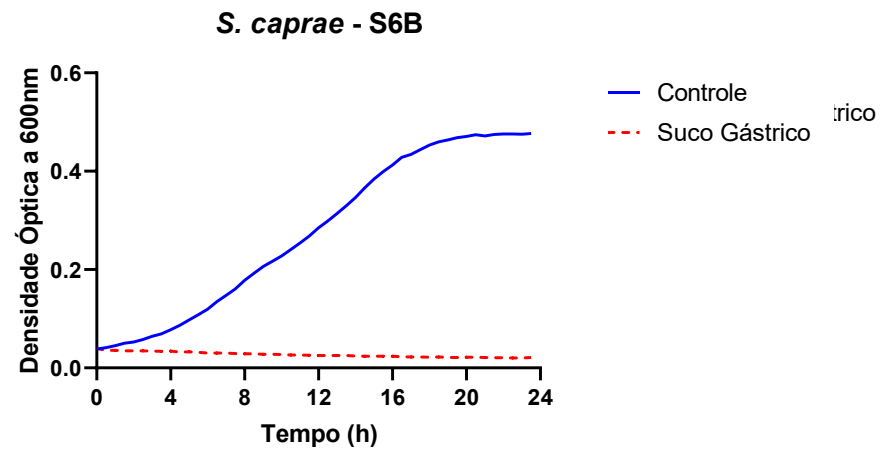
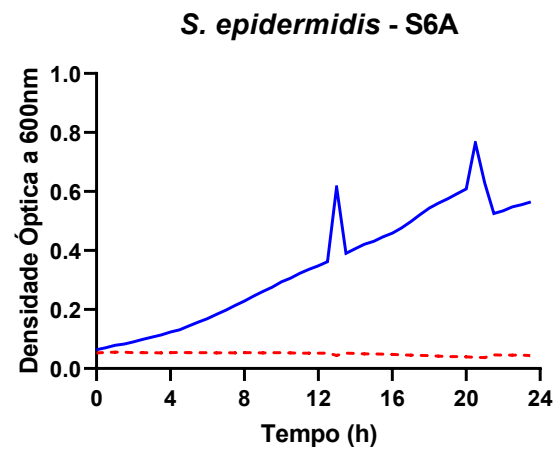
L. reuteri* - A7E**L. reuteri* - A7J*****L. reuteri* - A7K*****L. mucosae* - A8C**

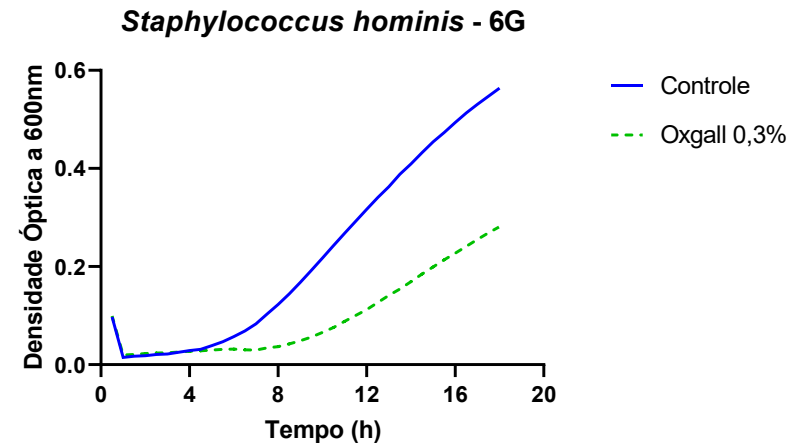
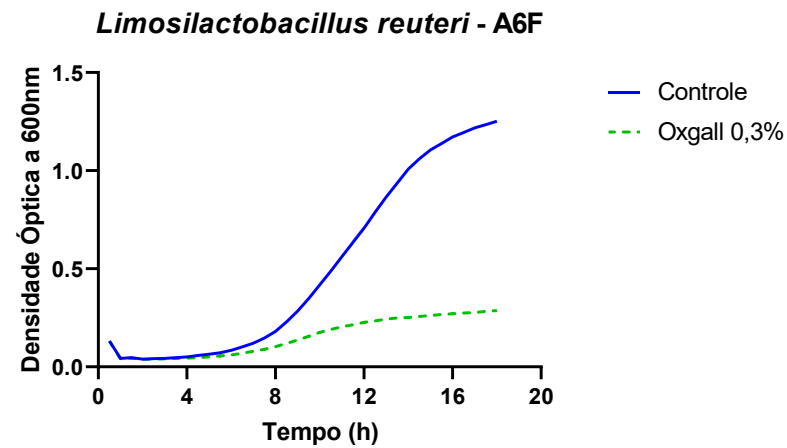
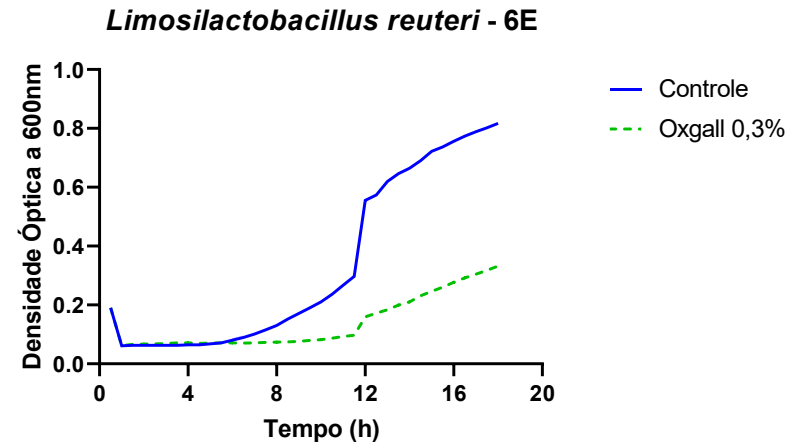
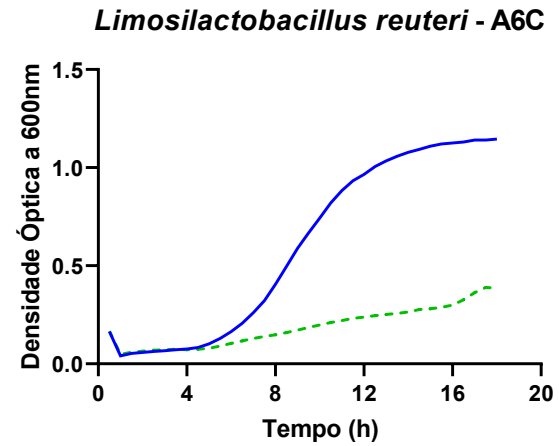
L. reuteri* - A8E**L. reuteri* - A8G*****L. reuteri* - 8H*****E. hirae* - S2A*****L. reuteri* - 8K*****E. hirae* - S3A**

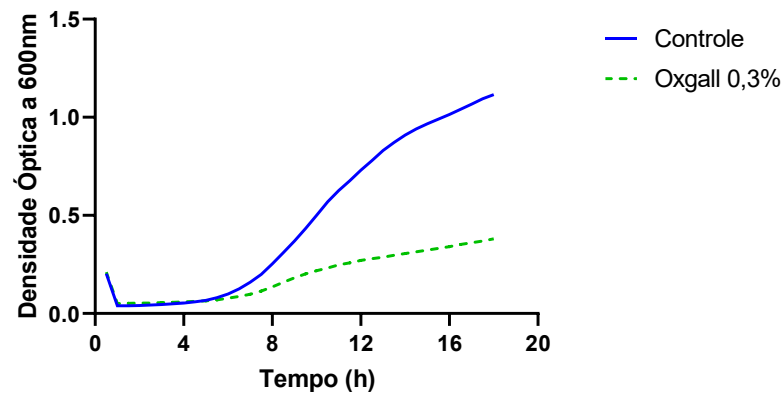
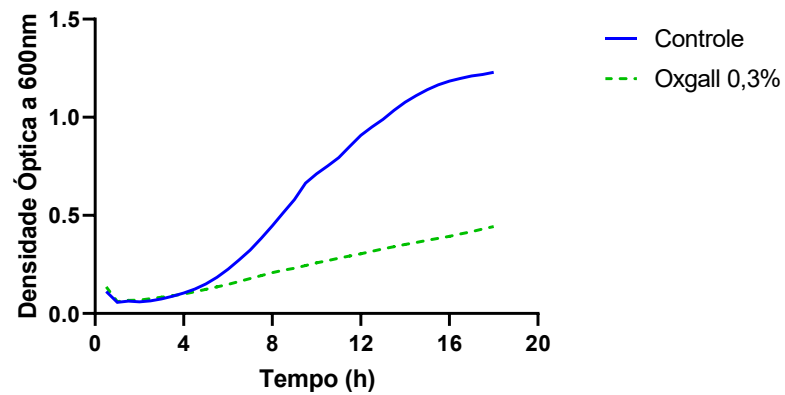
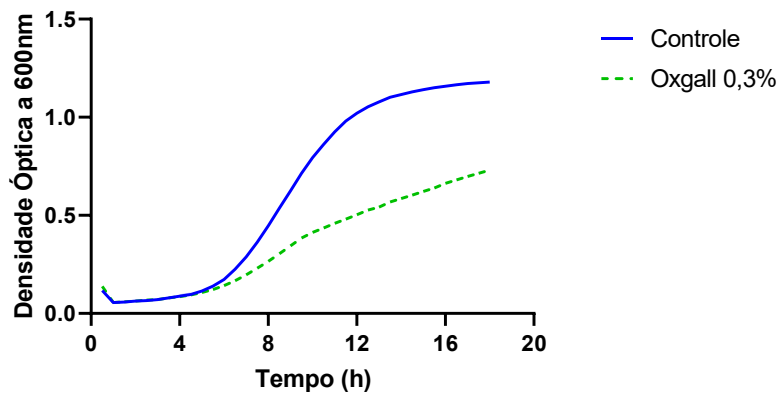
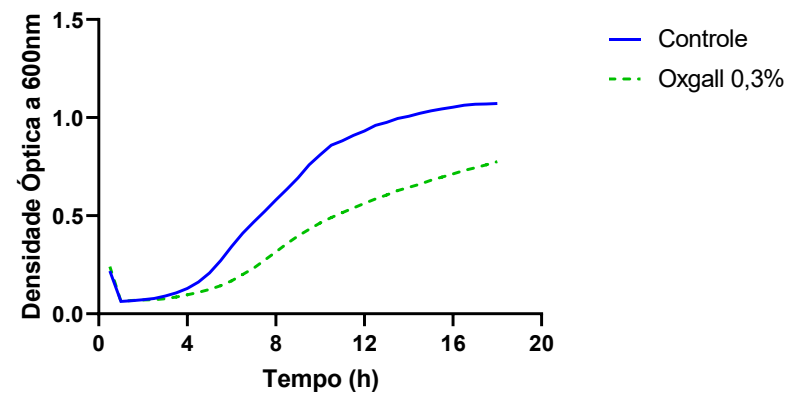
E. hirae - S4A*E. hirae* - S5B*L. reuteri* - S6D*L. reuteri* - S6E

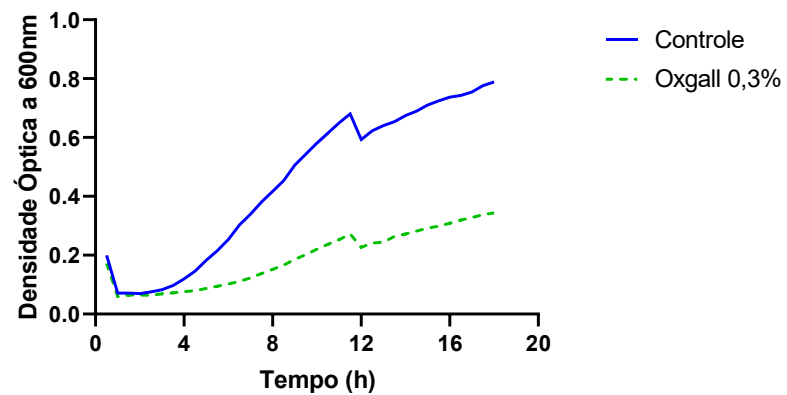
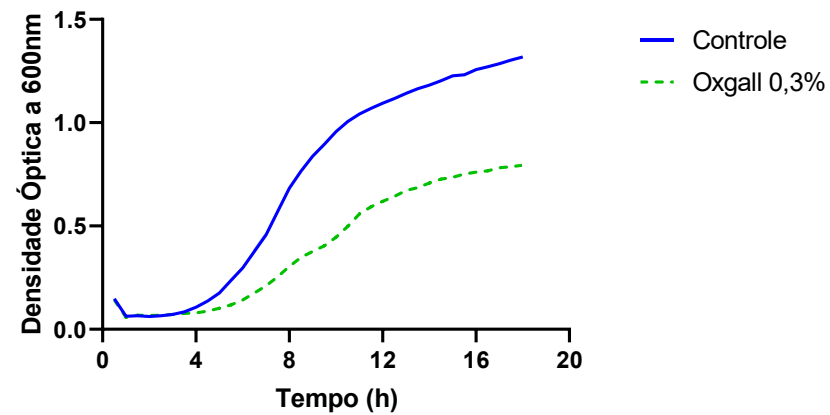
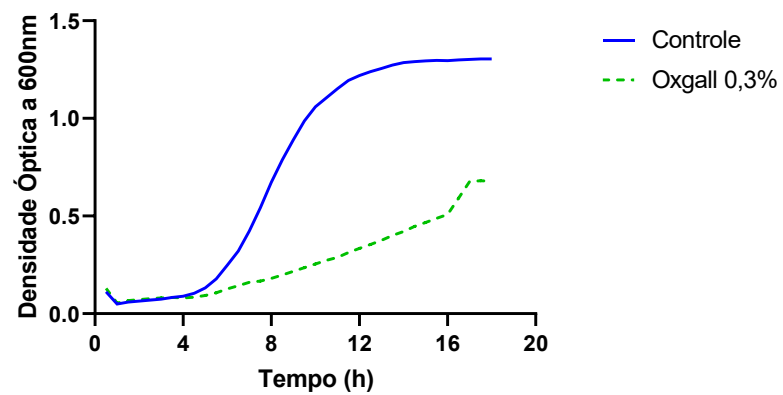
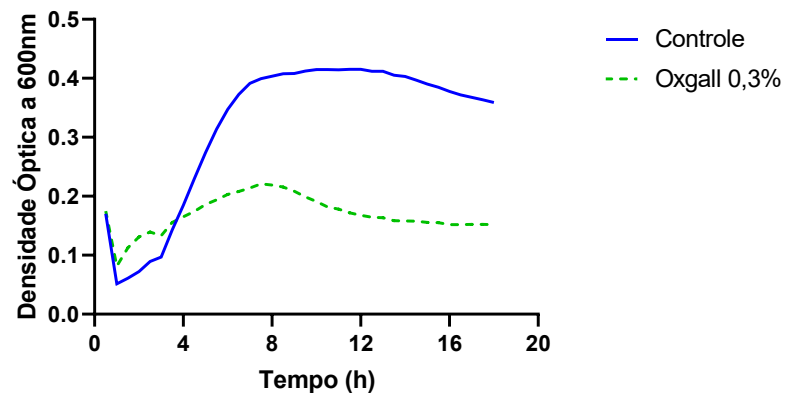
L. reuteri* - S9A**L. reuteri* - S9C*****L. reuteri* - S10B*****L. plantarum* - 6A-1**

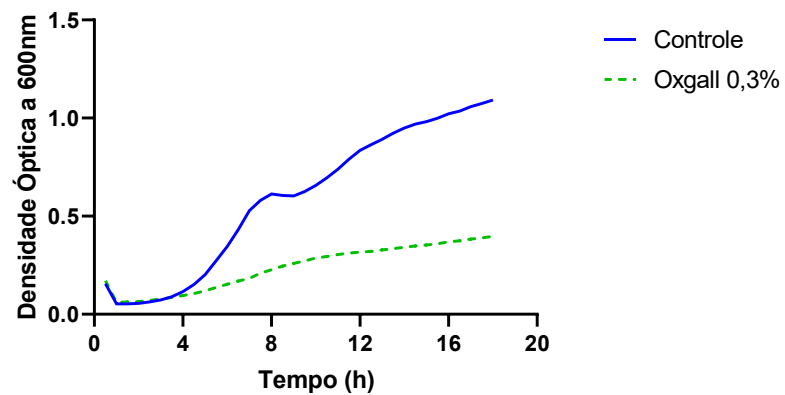
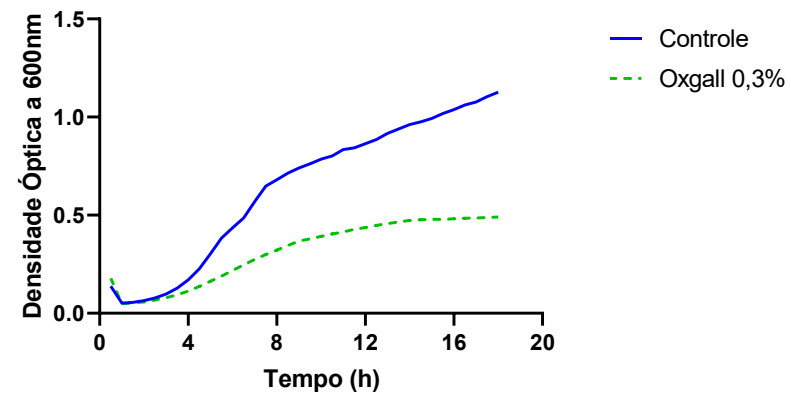
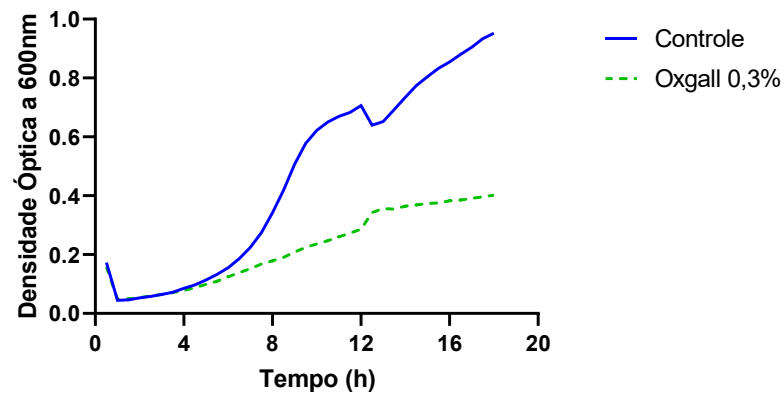
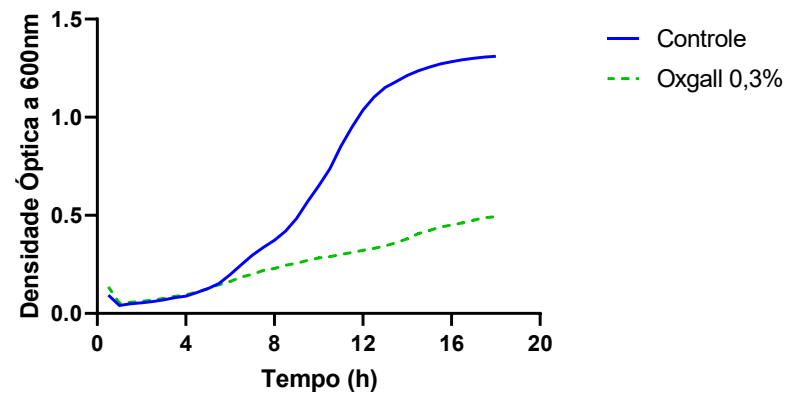


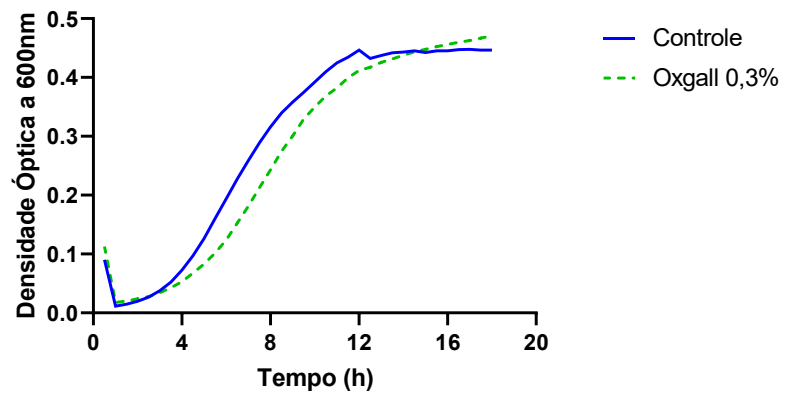
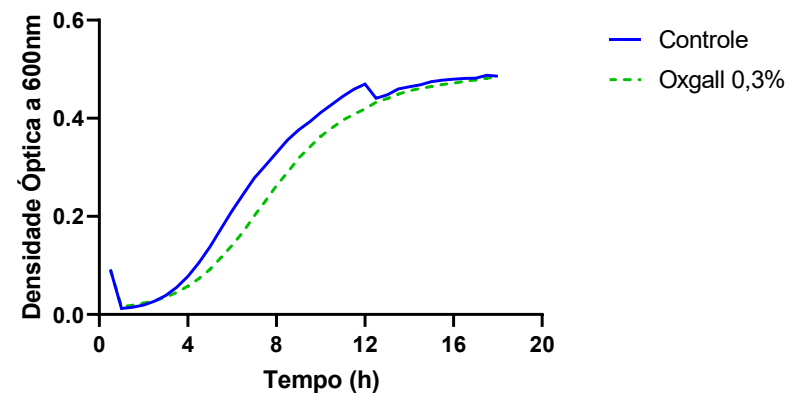
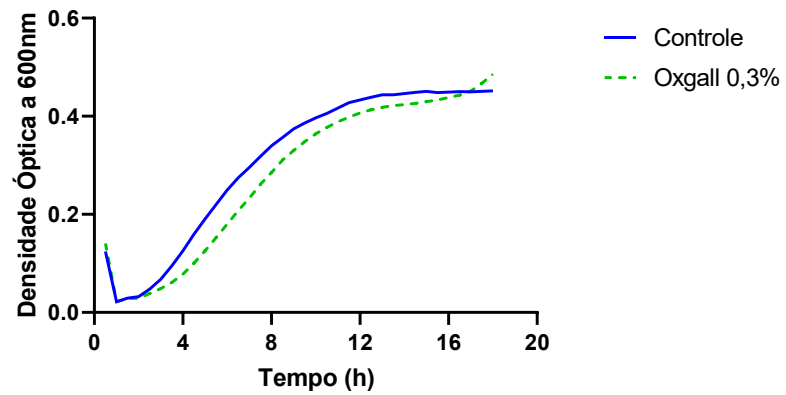
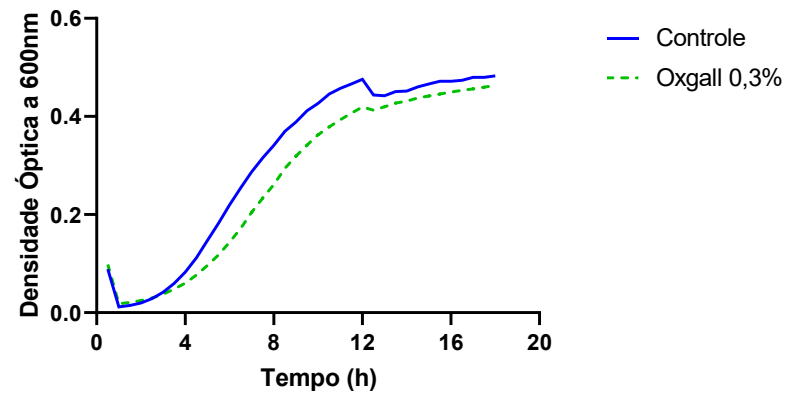


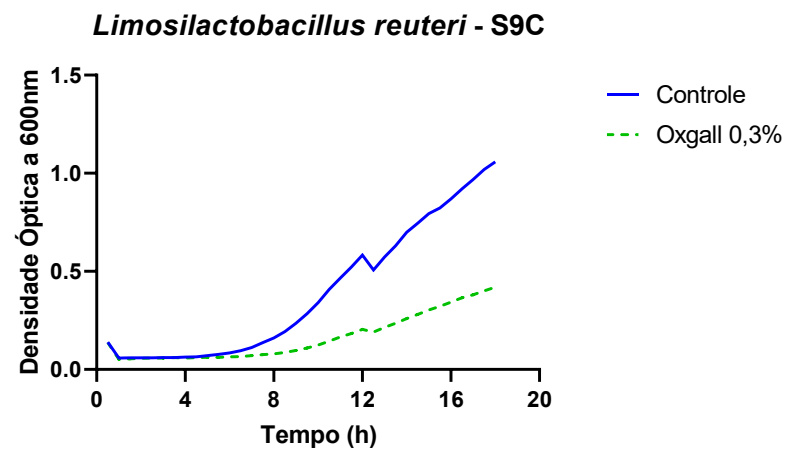
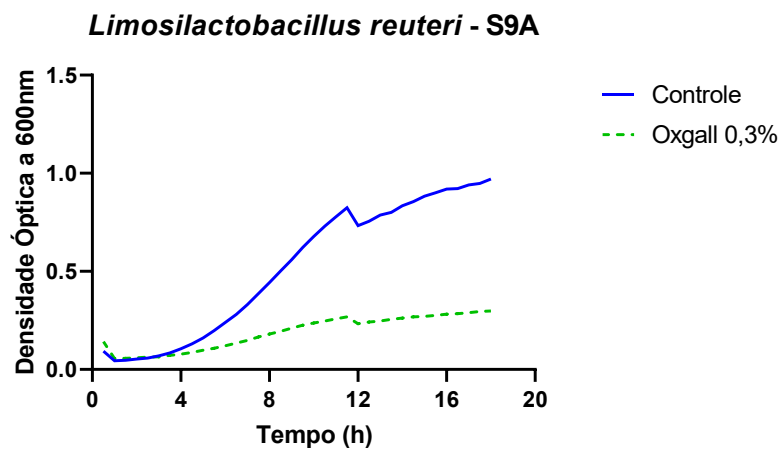
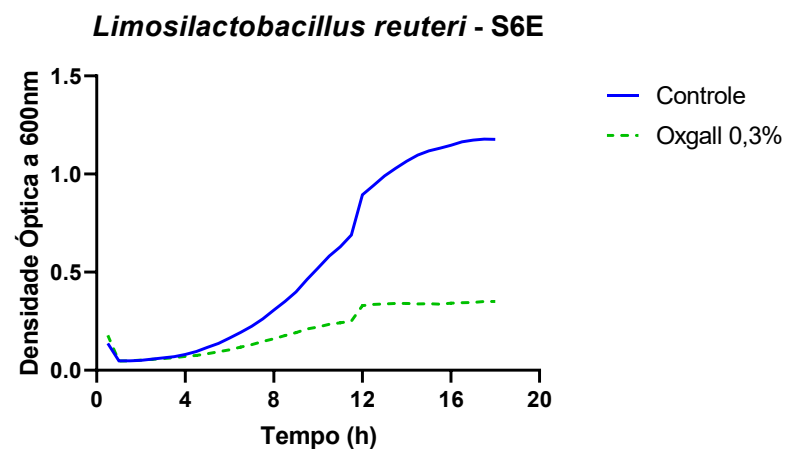
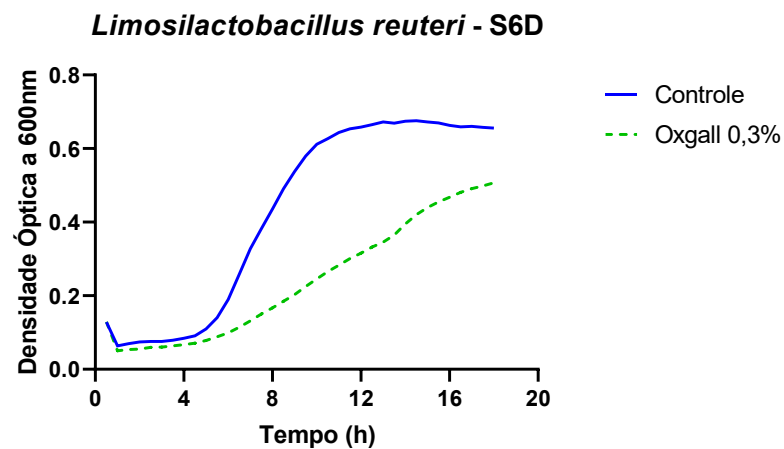
Apêndice B - Curvas de crescimento dos isolados na presença e ausência de sais biliares (0,3% Oxigall)

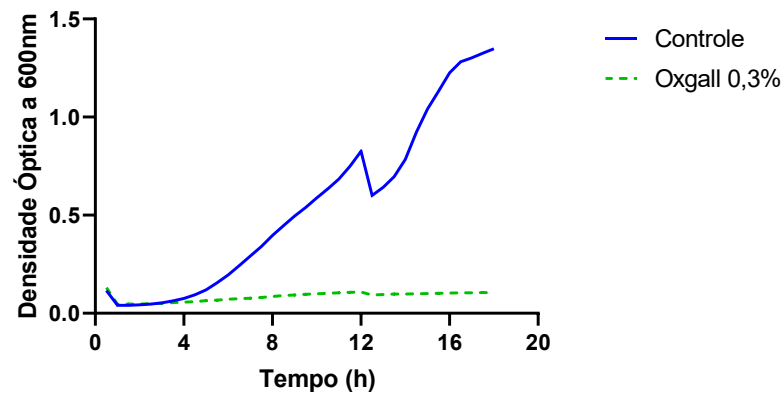
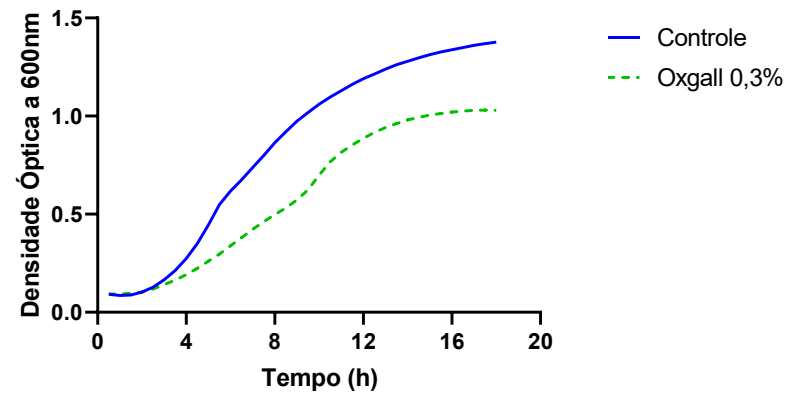
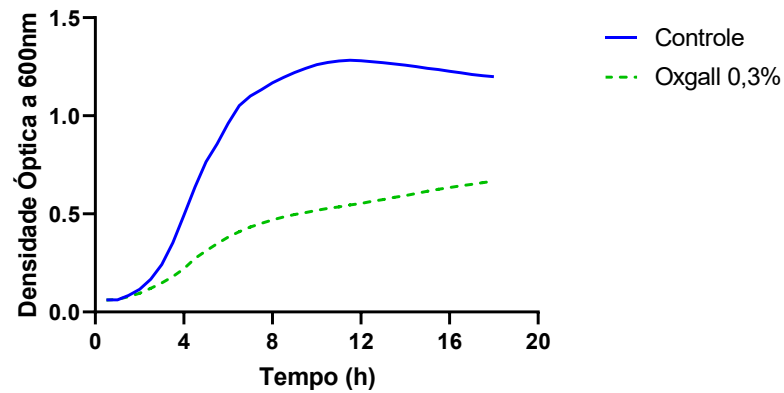
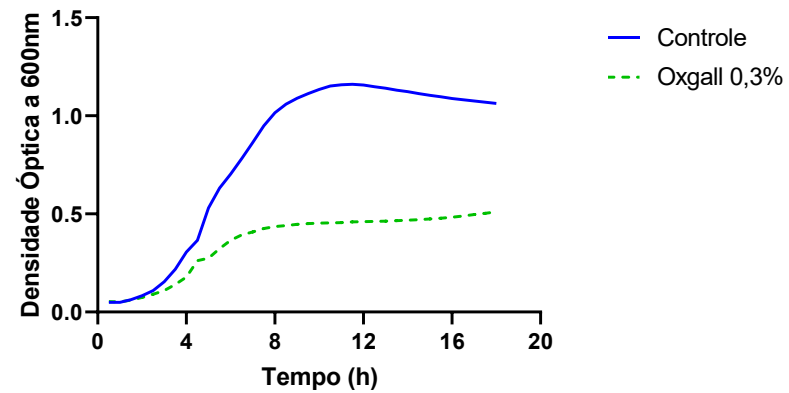
Limosilactobacillus reuteri* - A6H**Limosilactobacillus reuteri* - A7A*****Limosilactobacillus reuteri* - A7B*****Limosilactobacillus reuteri* - A7D**

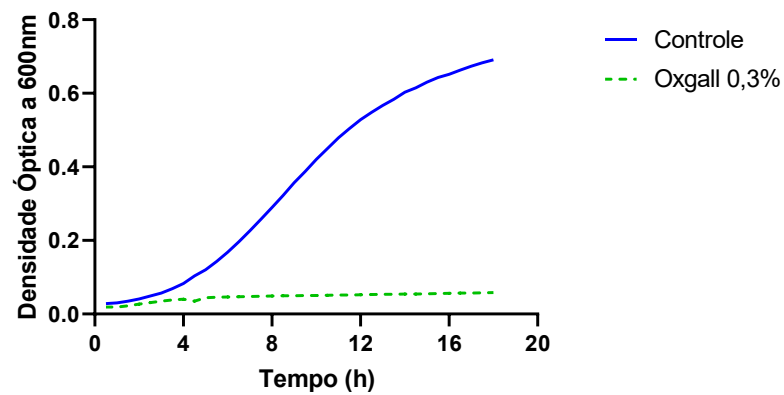
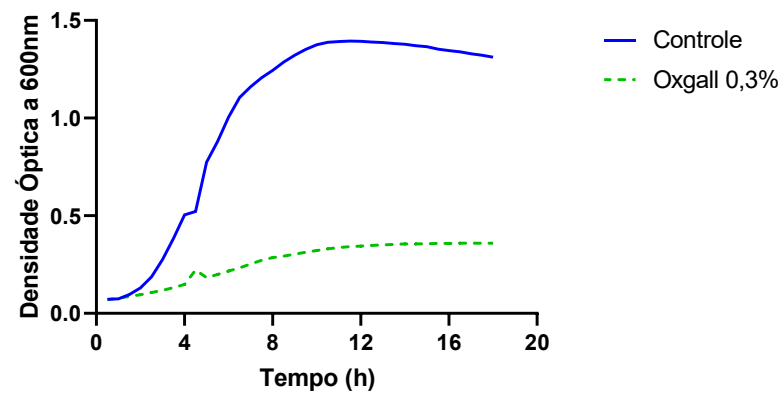
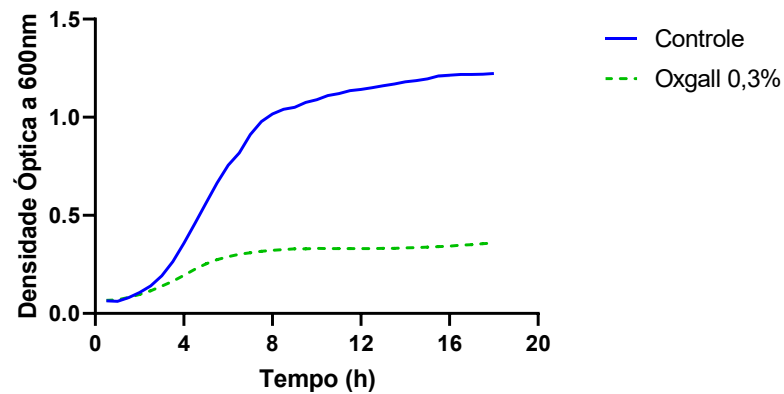
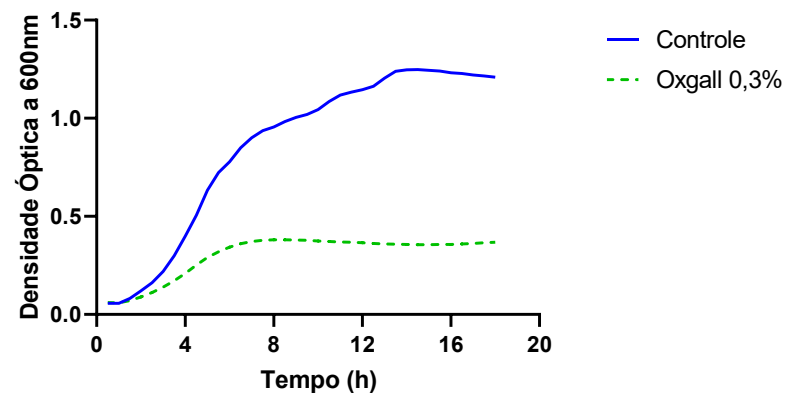
Limosilactobacillus reuteri* - A7E**Limosilactobacillus reuteri* - A7J*****Limosilactobacillus reuteri* - A7K*****Limosilactobacillus mucosae* - A8C**

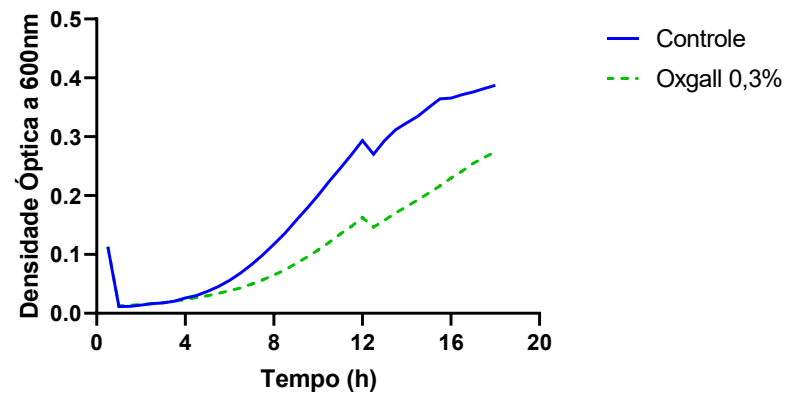
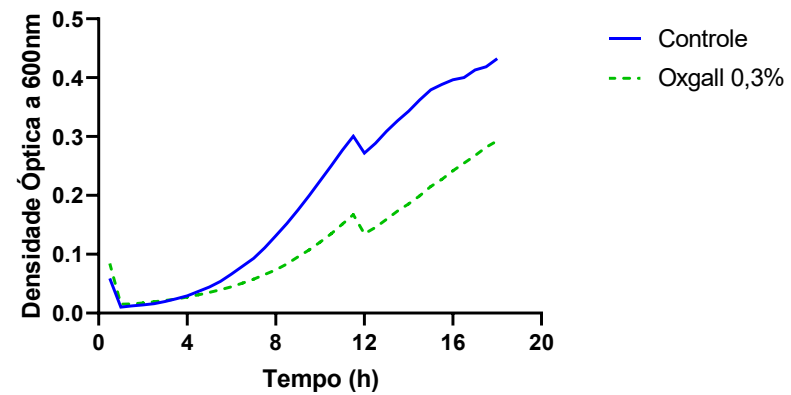
Limosilactobacillus mucosae* - A8E**Limosilactobacillus mucosae* - A8G*****Limosilactobacillus mucosae* - 8H*****Limosilactobacillus mucosae* - 8K**

Enterococcus hirae* - S2A**Enterococcus hirae* - S3A*****Enterococcus hirae* - S4A*****Enterococcus hirae* - S5B**



Limosilactobacillus reuteri* - S10B**Lactiplantibacillus plantarum* - 6A-1*****Limosilactobacillus reuteri* - A6D-2*****Limosilactobacillus reuteri* - 7C-1**

Staphylococcus warnei* - A7F-2**Limosilactobacillus reuteri* - A7G-1*****Limosilactobacillus reuteri* - A7H-2*****Limosilactobacillus reuteri* - A7I-1**

Staphylococcus epidermidis* - S6A**Staphylococcus caprae* - S6B**

Apêndice C – Atividade antagônica dos isolados bacterianos de felinos contra patógenos Gram positivo (Se: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Sa: *Staphylococcus aureus*).

Isolados		Bactérias Patogênica				
		Se	Pa	Lm	Ef	Sa
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,15	29,31	-	37,39	-
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	25,94	22,33	-	31,92	-
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	30,52	27,57	-	30,31	-
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	25,13	-	26,23
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	35,15	-	38,07	30,17
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	32,43	-	-	22,21
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	25,98	21,25	-	29,36	-
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	29,11	32,97	19,76	25,29
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	39,36	34,26	22,80	24,97
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	29,05	27,21	32,85	19,42
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	31,26	32,49	22,02	34,40	37,16
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	11,98	-	-	-	-
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	-	9,92	-	-
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	-	-	38,56	-
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	34,77	25,40	29,52	-	-
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	34,66	32,76	22,45	-	-
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	16,44	-	24,58	-	22,83
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	18,06	22,34	27,86	-	26,31
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	29,08	24,50	20,48	-	-
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	17,52	22,68	20,01	-	23,09
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	-	23,41	-	-	-
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	32,63	30,21	-	28,79	32,73
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	25,23	24,20	-	26,06	-
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,15	26,03	-	32,40	-
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	30,73	32,62	-	35,52	-
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	22,84	25,74	45,46	22,28	31,78
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	17,18	24,52	-	24,96	-
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	27,36	31,45	-	25,20	-
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	-	-	22,72	-	-
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	25,65	32,70	24,24	26,55	14,63
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	32,48	34,07	-	23,38	-
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,45	31,55	20,64	27,87	-
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	21,12
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	-	-	-	-	-

Apêndice D - Síntese dos resultados de caracterização dos probiótica dos isolados felinos.

Isolados	SG ¹	SB ¹	MATS	Aurto-Agregação	Co-agregação					Antagonismo	
					Se ²	Pa ²	Lm ²	Ef ²	Sa ²		
A6C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	+ + - + -
6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Médio	B	M	M	B	M	+ + - + -
A6F	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	B	M	++-+-
6G	<i>Staphylococcus hominis</i>	S	T	Hidrofilica	Médio	M	M	M	M	B	- - + - +
A6H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	M	B	B	M	- + - + +
A7A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Médio	M	M	M	B	M	- + - - +
A7B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	+ + - + -
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	R	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	M	M	- + + + +
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	- + + + +
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	A	M	M	M	- + + + +
A7K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	+ + + + +
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	B	M	B	B	+ - - - -
A8E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	T	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	- - + - -
A8G	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Médio	B	B	B	B	B	- - - + -
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	M	B	B	M	+ + + - -
8K	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	B	M	+ + + - -
S2A	<i>Enterococcus hirae</i>	R	R	Hidrofilica	Médio	M	M	M	B	M	+ - + - +
S3A	<i>Enterococcus hirae</i>	R	R	Hidrofilica	Médio	B	M	M	B	M	+ + + - +
S4A	<i>Enterococcus hirae</i>	R	R	Hidrofilica	Médio	M	M	M	B	M	+ + + - -
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	R	R	Hidrofilica	Médio	M	M	M	M	M	+ + + - +
S6D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	- + - - -
S6E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Médio	B	M	M	B	M	+ + - + +
S9A	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	+ + - + -
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	+ + - + -
S10B	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	B	M	+ + - + -
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	R	R	M.Hidrofóbica	Baixo	M	A	M	B	M	+ + + + +

A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++-+-
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	T	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++-+-
A7F2	<i>Staphylococcus warnei</i>	S	S	M.Hidrofóbica	Baixo	M	M	M	M	M	--+--
A7G1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	B	M	+++++
A7H2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	M	M	++-+-
A7I1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	R	S	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	B	M	++++-
S6A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	Hidrofilica	Baixo	M	M	M	M	M	----+
S6B	<i>Staphylococcus caprae</i>	S	T	Hidrofilica	Baixo	B	M	M	B	M	-----

¹ SG: Suco Gástrico, SB: Sais Biliares, R: Resistente, T: Tolerante, S: Sensível

² Se: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Sa: *Staphylococcus aureus*. A: Alto, M: Médio, B: Baixo

Apêndice E – Diâmetro dos halos observados no antibiograma

Isolados		Antibióticos									
		DO	CL	AM	CZ	CF	MR	EN	CE	CR	PE
6 A1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	27,77	32,58	33,94	23,11	0,00	0,00	0,00	26,74	34,48	20,07
A6D2	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	36,74	53,16	55,31	51,88	25,18	0,00	0,00	33,72	60,21	50,13
7C1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	44,20	44,10	57,02	54,96	0,00	0,00	0,00	29,78	50,61	50,66
A7D	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,95	36,32	40,78	40,37	0,00	0,00	6,52	13,46	39,05	49,68
A7E	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	33,03	35,37	33,23	32,27	5,93	0,00	6,19	15,08	30,60	33,19
A7J	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	36,57	38,45	34,43	34,16	5,74	0,00	6,81	15,03	33,54	46,15
A8C	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	35,65	43,33	48,52	38,02	0,00	0,00	0,00	53,12	65,50	40,99
8H	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	26,57	32,95	44,50	48,49	0,00	0,00	0,00	12,29	46,98	47,90
S5B	<i>Enterococcus hirae</i>	19,28	26,49	32,34	30,13	19,99	13,47	13,33	24,56	26,30	34,80
S9C	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	39,00	36,44	37,37	42,09	12,95	0,00	0,00	12,57	36,22	45,36

Os antimicrobianos utilizados foram Doxiciclina (DO), Clorafenicol (CL), Amoxicilina (AM), Cefazolina (CZ), Cefoxitina (CF), Marbofloxacina (MR), Enrofloxacina (EN), Cefalexina (CE), Ceftriaxona (CR), Penicilina (PE)

ANEXOS

Anexo A – Consentimento livre e esclarecido dos tutores

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo do projeto: Prospecção de probióticos e posbióticos para adição em formulações medicamentosas e alimentícias para gato doméstico

Nome do pesquisador principal: Elisabeth Neumann

Razão social e Ciaepr instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais Ciaepr: 02.044.2019

Objetivos do estudo: Construir um banco de linhagens bacterianas, isoladas de fezes e cavidade oral de gatos domésticos, com comprovada ação probiótica e resistentes à liofilização, e de posbióticos relacionados a essas linhagens, que possam compor formulações medicamentosas e alimentícias destinadas a esses animais.

Procedimentos a serem realizados com os animais: No dia do desmame dos filhotes, cada animal será gentilmente retirado do local onde é mantido e, se possível, serão colhidas amostras de fezes após estimulação anal que serão acondicionadas em frasco esterilizado. Caso não se consiga coletar as fezes expelidas pelo animal, a colheita será feita diretamente da ampola retal, com o uso de *swab* esterilizados. O conteúdo da cavidade oral será colhido passando-se de maneira lenta e cuidadosa um *swab* esterilizado pela superfície interna da boca do animal.

Potenciais riscos para os animais: pode haver um leve desconforto para o filhote no momento de passar o *swab* pelas superfícies corporais, mas nada que comprometa o bem-estar do animal.

Cronograma: Será necessária apenas uma coleta em dia e hora definidos pelo tutor.

Benefícios: os resultados dessa pesquisa podem contribuir para o desenvolvimento de formulações probióticas e pósbióticas que poderão ser administradas aos gatos para auxiliar na manutenção da saúde do animal. Essas mesmas formulações poderão ser utilizadas por cães.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto: – Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. – Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). – A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. – Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. – A equipe do Pesquisador Principal Elisabeth Neumann se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante a coleta do material. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos: Tel. de emergência: (31)98864-3026

Equipe: Elisabeth Neumann, Álvaro cantini Nunes, Patrícia Lima Costa e Alessandra Alexandrino Diniz Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, ICB, Sala H3-80, Pampulha, Belo Horizonte Telefone: (31)3409-2737



DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Cidade/UF, dd/mm/aaaa: Belo Horizonte, 05/03/2024

Assinatura do Responsável: Mariana da Janda Oliveira

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome: Marcília Júlia de Andrade Oliveira

Documento de Identidade (quando aplicável): M613250.174

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Sem nome

Número de identificação: 1

Espécie: Felis catus

Raça: SRD (Sem raça definida)

Nome: Sem nome

Número de identificação: 2

Espécie: Felis catus

Raça: SRD

Nome: Sem nome

Número de identificação: 3

Espécie: Felis catus

Raça: SRD



Nome: Sem nome
Número de identificação: 4
Espécie: Felix catus
Raça: SRD

Nome: Sem nome
Número de identificação: 5
Espécie: Felix catus
Raça: SRD

De acordo,

Elisabeth Neumann



Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, número 177/2023)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Prospecção probióticos e posbióticos para adição em formulações medicamentosas e alimentícias para gato doméstico", protocolo do CEUA: 177/2023 sob a responsabilidade de Elisabeth Neumann que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 28/08/2023.

Vigência da Autorização	28/08/2023 a 27/08/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Gatos / SRD
Nº de animais	5
Peso/Idade	500g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Ambientes domésticos diversos
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	384
Peso/Idade	20g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	120
Peso/Idade	20g / 4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	504
Idade	4(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Gatos / SRD
Nº de animais	5
Idade	4(semanas)

Sexo	indiferente
Origem	Ambientes domésticos diversos

Considerações posteriores:

28/08/2023	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/08/2023. Validade: 28/08/2023 a 27/08/2028.
------------	---

Belo Horizonte, 10/10/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br