

**LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA**

**PARÂMETROS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE  
BACTÉRIAS BÍFIDAS ISOLADAS DE RECÉM-NASCIDOS, COM  
INDICAÇÃO DE USO COMO PROBIÓTICO EM BANCOS DE  
LEITE HUMANO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS -BRASIL  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA**

**PARÂMETROS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE  
BACTÉRIAS BÍFIDAS ISOLADAS DE RECÉM-NASCIDOS, COM  
INDICAÇÃO DE USO COMO PROBIÓTICO EM BANCOS DE  
LEITE HUMANO**

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

APROVADA: 5 DE MAIO DE 2006

---

**Prof. Antônio Fernandes de  
Carvalho**

---

**Profª Izabel Regina dos S. Costa  
Maldonado**

---

**Prof. José Ivo Ribeiro Júnior  
(Conselheiro)**

---

**Profª Neuza Maria Brunoro Costa  
(Conselheira)**

---

**Profª Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira  
(Orientadora)**

Aos meus pais

Abel e Lúcia

Aos meus irmãos

Mariana e Leandro

Ao Dinarte

Aos meus avós Odilon e Carlita e ao meu primo Igor

## AGRADECIMENTO

À Deus, por tudo na minha vida.

Aos meus pais Abel e Lúcia pelo amor incondicional, carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida

Aos meus irmãos Mariana e Leandro, pelo carinho e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dinarte, pelo carinho, dedicação, e pela companhia durante os inúmeros finais de semana no Bioagro e por sempre estar presente nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

A professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, pela orientação, ensinamentos, oportunidades, e amizade ao longo desses anos.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, pela competência, paciência e valiosa ajuda profissional no desenvolvimento desse trabalho.

A professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela receptividade e boa vontade em participar desse trabalho.

A professora Izabel, pelo apoio, carinho, disponibilidade e valiosa contribuição na realização desse experimento.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovanni, pelo carinho, atenção e constantes ensinamentos .

A Maria da Penha Piccolo Ramos, pela amizade e valiosa ajuda na realização desse trabalho.

As minhas estagiárias (o) e grandes amigas Flávia, Karina, Elisângela, Carolina, Mariana, Tobias e Natália pelo apoio, dedicação e preciosa ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de culturas lácticas, José Manoel, Natan, Célio, Juliana pela colaboração, companheirismo e bons momentos passados juntos.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Vaninha, Geralda, Lúcia, Dona Lígia, Sr. Manoel, Sr Luis, Dimas, Célio, Adão, Pio, Osvaldo, Fernando, Valério, Juarez, Sr Zé, Tiago.

Aos funcionários do BIOAGRO, em especial o Sr Paulo e Sr Toninho pela colaboração, carinho e ajuda durante o desenvolvimento desse experimento.

Aos colegas do Departamento de Nutrição, Cassiano, Pâmela, Jôse pelo carinho, dedicação e ajuda durante todo o experimento com os ratos.

A meu avô Odilon Rodrigues e ao meu primo Igor R. da Silva, mesmo não estando mais entre nós, tenho certeza que torceram muito por mim.

A minha avó Carlita, minhas tias, tios, primos e primas pelo apoio e carinho.

Ao casal Maria e Vicente Lelis, pelo carinho, apoio e incentivos constantes.

A Denilce, pelo carinho, apoio e descontração durante todos esses anos.

Ao meu mais novo irmão Mário (Chumbinho), pelo despreendimento e valiosa ajuda

A minha amiga Edith, pela amizade incondicional.

Aos colegas da pós graduação pela amizade, convívio e troca de experiências.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA, filha de Abel Fernandes da Cunha e Lúcia Maria Rodrigues da Cunha, nasceu em 23 de novembro de 1980, em Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2004, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa - MG.

Em março de 2004, iniciou o Programa de Pós- Graduação, em nível de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, MG, realizando seus estudos na área de probióticos e culturas lácticas.

## ÍNDICE

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Probióticos e Saúde Humana .....	4
2.2. Importância de Bactérias Probióticas no Desenvolvimento da Microbiota Intestinal Benéfica .....	6
2.2.1. Importância do Leite Materno no Desenvolvimento de Bactérias Bífidas no Intestino .....	7
2.2.2. Leite Materno e seu Papel na Saúde da Criança .....	8
2.2.3. Bancos de Leite Humano .....	10
2.2.4. Bactérias Bífidas .....	12
2.2.5. Efeitos Benéficos Conferidos por Bactérias Bífidas .....	13
2.3. Segurança dos Microrganismos Probióticos .....	14
2.3.1. Sensibilidade a Antibióticos .....	15
2.3.1.1. Principais Classes de Antibióticos .....	17
2.3.1.1.1. Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos .....	17
2.3.1.1.1.1. Penicilinas .....	17
2.3.1.1.1.2. Cefens (cefalosporina) .....	19
2.3.1.1.1.3. Carbapenêmicos .....	20
2.3.1.1.1.4. Monobactanos .....	21
2.3.1.1.2. Antibióticos Glicopeptídicos .....	21
2.3.1.1.3. Antibióticos Aminoglicosídicos .....	22
2.3.1.1.4. Macrolídeos .....	23
2.3.1.1.5. Sulfonamidas .....	24
2.3.2. Antagonismo de Bactérias Probióticas sobre Patógenos ...	25
2.3.2.1. Produção de ácidos orgânicos .....	25
2.3.2.2. Produção de bacteriocinas e/ou moléculas semelhantes à bacteriocinas .....	27
2.3.2.3. Produção de $H_2O_2$ .....	29
2.3.2.4. Imunomodulação .....	30
2.3.3. Translocação bacteriana .....	31
2.3.3.1. Supercrescimento Bacteriano .....	32
2.3.3.2. Deficiências das defesas imunológicas do hospedeiro ..	34
2.3.3.3. Injúria da mucosa intestinal .....	35



CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal .....	38
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. OBJETIVOS .....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.1. Origem e Manutenção dos isolados de bactérias bífidas .....	39
3.2. Ativação dos Isolados .....	40
3.3. Perfil de Sensibilidade aos Antibióticos .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1. Perfil de Sensibilidade a Antibióticos .....	41
5. CONCLUSÃO .....	49
CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos .....	50
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. OBJETIVOS .....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
3.1. Origem e manutenção dos isolados de <i>Bifidobacterium breve</i> .....	51
3.2. Ativação dos isolados de <i>Bifidobacterium breve</i> .....	52
3.3. Origem, manutenção e ativação dos microrganismos patogênicos indicadores .....	52
3.4. Avaliação do efeito antagonista .....	52
3.4.1. Difusão em placas .....	53
3.4.2. Teste “Spot” .....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
4.1. Antagonismo pelo método difusão em placas .....	54
4.2. Antagonismo pelo método “spot” .....	55
5. CONCLUSÃO .....	59
CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas .....	60
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. OBJETIVO GERAL .....	62
2.1. Objetivos específicos .....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	62

3.1. Origem e manutenção dos isolados .....	62
3.2. Determinação do <i>pool</i> probiótico .....	63
3.2.1. Resistência a sais biliares e ao suco gástrico .....	63
3.2.2. Sensibilidade a antibióticos .....	63
3.3. Ativação dos isolados .....	64
3.4. Compatibilidade dos isolados de bactérias bífidas .....	64
3.4.1. Ensaio pelo método “Spot” .....	64
3.4.2. Ensaio Difusão em placas .....	65
3.5. Coleta do leite materno .....	65
3.6. Preparo do concentrado bacteriano .....	66
3.7. Toxicidade oral crônica e translocação bacteriana .....	67
3.7.1. Avaliação da toxicidade por índice de peso do órgãos .....	68
3.7.2. Avaliação da translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço .....	68
3.7.3. Caracterização das bactérias translocadas .....	69
3.7.3.1. Perfil de fermentação de carboidratos das bactérias translocadas .....	69
3.7.4. Análise Estatística .....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.1. Composição do <i>pool</i> probiótico .....	71
4.2. Compatibilidade dos isolados .....	72
4.3. Número de células viáveis no <i>pool</i> de bactérias bífidas do concentrado .....	72
4.4. Avaliação da toxicidade por índice de peso dos órgãos .....	72
4.5. Translocação bacteriana para diferentes órgãos .....	76
4.5.1. Contagem de bactérias anaeróbias no fígado, rins, coração e baço .....	76
5. CONCLUSÃO .....	81
CONCLUSÃO GERAL .....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

## ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1: Penicilinas naturais (TORTORA et al., 2000). .....	18
Figura 2: Penicilinas semi-sintéticas (TORTORA et al., 2000). .....	19
Figura 3: Estrutura química da Cefalosporina.....	20
Figura 4: Estrutura química do meropenem.....	21
Figura 5: Estrutura química do aztreonam.....	21
Figura 6: Estrutura química da vancomicina.....	22
Figura 7: Estrutura do antibiótico gentamicina (TORTORA 2000). .....	23
Figura 8: Estrutura do antibiótico eritromicina (TORTORA et al., 2000). .....	24
Figura 9: Comparação entre as estruturas do PABA e da sulfonamida (TORTORA et al., 2000). .....	25
CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal .....	38
Figura 1: Susceptibilidade da estirpe UFVCC 1083 a alguns dos agentes antimicrobianos avaliados. ....	47
CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos .....	50
Figura 1: Atividade antagonista de bactérias bífidas isoladas de recém nascidos a <i>Salmonella typhimurium</i> pela técnica difusão em placas (a) e “spot” (b). .....	55
CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas .....	60
Figura 1: Elaboração do <i>pool</i> de leite humano pasteurizado acrescido de bactérias bífidas (LPB) ou não (LP). .....	66
Figura 2: Estimativas dos índices do fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico. 73	
Figura 3: Pesos de ratos “Wistar” do grupo basal (T0), controle, e daqueles tratados com leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico por 21 dias. ....	75
Figura 4: Estimativas das contagens Log (UFC/mL) de bactérias anaeróbias totais no fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico. ....	77

## ÍNDICES DAS TABELAS

CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal .....	38
Tabela 1: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil.....	42
Tabela 1a: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont). ....	43
Tabela 1b: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont). ....	44
Tabela 2: Susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de fezes de recém nascidos.....	45
CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos .....	50
Tabela 1: Número de estirpes de bactérias bífidas que apresentaram antagonismo aos patógenos testados.....	56
CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas .....	60
Tabela 1: Características de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de crianças . ....	71
Tabela 2: Estimativa dos contrastes envolvendo os índices dos órgãos e peso dos animais avaliados. ....	73
Tabela 3: Estimativa dos contrastes envolvendo o Log do número de células (UFC/g) nos órgãos dos animais avaliados.....	77
Tabela 4: Caracterização de bactérias* anaeróbias totais translocadas para os diferentes órgãos analisados pelo perfil de fermentação de carboidratos (Kit API CH 50 - BioMerieux – France). ....	78

## RESUMO

CUNHA, Luciana Rodrigues da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2006. **Parâmetros de segurança e funcionalidade de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos, com indicação de uso como probiótico em bancos de leite humano.** Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e José Ivo Ribeiro Júnior.

O objetivo desse trabalho foi avaliar alguns parâmetros de segurança e funcionalidade atualmente recomendados para validação de novas estirpes de *Bifidobacterium breve*, isoladas de recém nascidos com potencial de uso como probiótico em bancos de leite humano. Foram avaliados susceptibilidade antimicrobiana, antagonismo a patógenos, toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. A experimentação foi dividida em três fases. Na primeira, avaliou-se a susceptibilidade de 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* aos principais antimicrobianos (14) utilizados em UTI-neonatal nas instituições brasileiras. Na segunda fase, avaliou-se o antagonismo das estirpes sobre o crescimento de *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, utilizando-se a técnica “spot” e difusão em placas. Para excluir o efeito inibitório dos ácidos orgânicos realizou-se também o teste “spot” em meio tamponado com bicarbonato de sódio. Baseado nos resultados encontrados no teste de sensibilidade a antibióticos e naqueles de resistência a sais biliares e suco gástrico obtidos em estudos anteriores, foram selecionadas sete estirpes para comporem o *pool* probióticos que foi utilizado para verificação da toxicidade oral crônica e translocação bacteriana, na terceira fase do experimento, na qual empregou-se em cada repetição, 16 ratas Wistar com 21 a 23 dias de vida, recém desmamadas, que foram divididas em quatro grupos por unidade experimental: Basal, Controle, LP (Leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado

acrescido de bactérias bífidas). Os quatro animais que compuseram o grupo basal foram sacrificados no primeiro dia da experimentação (T0) e aqueles dos outros grupos foram alimentados diariamente (0,1 mL) via oral com auxílio de micropipeta esterilizada com diferentes dietas, durante 21 dias e posteriormente sacrificados. Fígado, rins, coração e baço, foram removidos, pesados e testados para verificação da toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. O experimento foi realizado em três repetições. Verificou-se que as 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* foram resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, amicacina e gentamicina, dentre os 14 antibióticos avaliados. Para os outros antimicrobianos, a sensibilidade variou de 2% (sulfonamida) a 100% (vancomicina, amoxicilina, ampicilina e penicilina). Esses mesmos isolados apresentaram variabilidade na atividade antagonística sobre o crescimento dos diferentes patógenos avaliados pelo método “spot”. Essa inibição foi estirpe dependente e não promovida somente por ácidos orgânicos, uma vez que não foi totalmente revertida quando utilizou-se meio tamponado. O sobrenadante livre de células de bactérias bífidas não promoveu inibição dos patógenos avaliados. Verificou-se que as estirpes de *Bifidobacterium breve* selecionadas (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 e 1111) não promoveram efeito adverso na saúde dos animais testados, uma vez que não induziram toxicidade oral crônica e nem translocação de bactérias do trato gastrointestinal para o fígado, rins coração e baço após os 21 dias da experimentação. No entanto, sugere-se a realização dos mesmos testes aqui avaliados com outros mamíferos, como coelhos, macacos e humanos para confirmar a segurança de uso desses isolados.

## ABSTRACT

CUNHA, Luciana Rodrigues da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2006. **Parameters of security and functionality of the *Bifidobacterium* isolated from newborn, with potential of use as probiotics in human milk banks.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa and José Ivo Ribeiro Júnior.

The objective of this study was to evaluate some parameters of security and functionality currently recommended for validation of probiotics. The parameters evaluated were antimicrobial susceptibility, antagonism to the growth of pathogens, oral chronic toxicity and bacterial translocation of new lineages of *Bifidobacterium breve* isolated from newborn, with potential of use as probiotics in human milk banks. The experiments were divided in three parts. In the first one, the susceptibility of 31 lineages of *Bifidobacterium breve* to the most common antimicrobials (14) used in UTI-neonatal from Brazilian institutions was evaluated. In the second part, the antagonism to the growth of lineages of *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was evaluated using the "spot" technique and plate diffusion. To exclude the effect of organic acid inhibition, the 'spot' test was also performed in buffered sodium bicarbonate medium. Based in the results found in the test of antibiotics sensitivity and in those of resistance to bile salts and gastric juice from previous studies, seven lineages were selected to compose the *pool* of probiotics that was used for verification of the oral chronic toxicity and bacterial translocation, in the third phase of the experiment, in which it was used for each replication 16 wearing Wistar rats with 21-23 days of life, were divided in 4 groups: Basal, Control, LP (pasteurized human milk) and LPB (pasteurized human milk containing bifid bacterium). The four animals that composed the basal group were sacrificed in the first day of the experiment (T0) while the others were fed with different

diets during 21 days and sacrificed later. Liver, kidneys, heart, and spleen were removed, weighed and tested for oral chronic toxicity and bacterial translocation. The experiment was conducted in three repetitions. It was found that the 31 lineages of *Bifidobacterium breve* were resistant to antimicrobial ciprofloxacin, ampicillin and gentamicin, among the 14 antibiotics evaluated. For the other antimicrobials, sensitivity varied from 2% (sulfonamide) to 100% (vancomycin, amoxicillin, ampicillin and penicillin). These same isolated varied in the antagonistic activity on the growth of the different pathogens evaluated by the "spot" method. This inhibition was lineage-dependent and not only promoted by organic acids, as it was not totally reverted in the buffered medium. The supernatant free of bifid bacteria cells did not promote inhibition of the pathogens evaluated. It was verified that the selected lineages of *Bifidobacterium breve* (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 and 1111) did not promote adverse effect in the animal health. Similarly, they did not induce oral chronic toxicity or translocation of bacteria of the gastrointestinal tract to the liver, kidneys, heart and spleen after 21 days of experimentation.



## 1. INTRODUÇÃO

A excelência do aleitamento materno é mundialmente reconhecida. O leite humano supre as necessidades nutricionais e energéticas do recém-nascido e o protege contra infecções (HEINIG, 2001). Apesar dos inúmeros benefícios conferidos por este alimento, muitas crianças (sadias e/ou prematuras) são privadas de ingeri-lo, pois, suas mães, pelos mais diferentes motivos não podem amamentá-las. Assim, os bancos de leite humano têm desempenhado um papel fundamental no fornecimento de leite para esses indivíduos (GIUGLIANI, 2002).

Por ser facilmente contaminado e veículo de várias doenças infecciosas, os bancos de leite humano tomam uma série de medidas de segurança para garantir a qualidade e inocuidade da matéria prima ali disponível (ARNOLD & LARSON, 1993). A pasteurização é uma prática de rotina nestes estabelecimentos e visa a eliminação de bactérias e vírus, potencialmente patogênicos. Entretanto, BORBA et al. (2003) constataram que esse processo reduz alguns constituintes do leite que podem ser imprescindíveis para o estabelecimento do gênero *Bifidobacterium* no trato intestinal dos recém nascidos, prejudicando, portanto, a formação de uma microbiota benéfica para os mesmos.

O desenvolvimento de uma microbiota predominantemente benéfica contribui para saúde do hospedeiro. Bactérias bífidas desempenham importante papel na manutenção do equilíbrio intestinal (KOPP-HOOLIHAN, 2001) e na prevenção da colonização de microrganismos patogênicos, por meio da produção de compostos inibidores (ácidos orgânicos e bacteriocinas), competição por nutrientes e sítios de adesão no epitélio intestinal, e modulação da resposta imune (FOOKS & GIBSON, 2002). Estudos têm mostrado resultados promissores alcançados pela administração de bactérias bífidas como por exemplo, proteção contra infecções intestinais (HARSHARNJIT, 2003), câncer de cólon (COMMANE et al., 2005), redução do colesterol (MODLER, 1994; LIN & CHEN, 2000), aumento da utilização da lactose por indivíduos intolerantes (GRIFFIN et al., 2002), efeito anti-tumor (SREEKUMAR, 2003), melhoria no metabolismo de proteínas e vitaminas (ARUNACHALAM, 1999, YOUNG & HUFFMAN,

2003). bem como estimulação do sistema imune (KALLIOMAKI et al., 2001; ISOLAURI, 2001).

Uma possível forma de compensar a inativação dos fatores bifidogênicos pela pasteurização, e uma vez que o tratamento térmico é um procedimento necessário, seria a adição direta de bactérias bífidas no leite pasteurizado nos bancos. Assim, as crianças ao invés de ingerir os fatores que estimulariam o crescimento de bactérias bífidas no intestino receberiam a espécie probiótica (BORBA, 2003).

Bifidobacterias têm longa história de uso seguro em produtos fermentados (SHORTT, 1999). Entretanto, nos últimos anos, alguns relatos têm identificado bactérias do ácido láctico probióticas, como por exemplo *Bifidobacterium breve* em meningite neonatal (HATA, et al., 1988; NAZAKAWA et al., 1996) e *Bifidobacterium longum* em casos de septicemia (YIM Há et al., 1999). No entanto, em nenhum dos casos foi comprovada a relação da infecção com o consumo do probiótico. Essas situações têm aumentado o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes que estão sendo introduzidas na cadeia alimentar humana. Aspectos de segurança, como origem das estirpes utilizadas, ausência de histórico de patogenicidade e de associação com doenças para o gênero, ausência de genes de resistência a antibióticos, dentre outros, são importantes critérios para a seleção de uma estirpe probiótica antes de sua incorporação aos produtos alimentícios (SAARELA et al., 2000). Outro aspecto de segurança recomendado é a verificação da toxicidade da estirpe, constatada de forma indireta por meio do crescimento anormal de alguns órgãos e sua capacidade de translocar para sítios extra-intestinais ou induzir translocação da microbiota intestinal endógena (ZHOU et al., 2000a).

A susceptibilidade antimicrobiana de novos isolados visa prevenir a entrada de estirpes resistentes a antibióticos na cadeia alimentar, e conseqüentemente, a disseminação da resistência para microrganismos patogênicos, uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos em humanos e promotores de crescimento em animais têm promovido a emergência de vários microrganismos resistentes (AUSTIN, 1999) causando sérios problemas no tratamento de infecções intestinais.

A avaliação da translocação bacteriana é importante uma vez que este é o primeiro passo no processo de infecções provocadas por microrganismos endógenos oportunistas (BERG, 1983). Muitos desses microrganismos, após atravessarem a barreira intestinal, podem se alojar nos nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço dentre outros, podendo desencadear septicemia, choque ou até mesmo levar a falência múltipla dos órgãos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). Estudos indicam que esse fenômeno é observado com mais freqüência por bactérias Gram-negativas e anaeróbias facultativas do que com anaeróbias obrigatórias e organismos Gram-positivos. *A priori*, a capacidade de bactérias probióticas translocarem do trato gastrointestinal para outros sítios não é desejável, uma vez que se desconhece qual o mecanismo envolvido nesta translocação e suas implicações para o hospedeiro (BENGMARK, 1998).

Tendo em vista o exposto acima e a implantação de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos em bancos de leite humano, esse trabalho objetivou avaliar alguns parâmetros de segurança e funcionalidade atualmente recomendados tais como, susceptibilidade antimicrobiana, antagonismo ao crescimento de patógenos, toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. Para tal, o estudo foi dividido em três fases em que a primeira objetivou-se selecionar dentre as estirpes de *Bifidobacterium breve* já isoladas de crianças, as mais sensíveis aos principais antibiogramas utilizados em UTIs neo-natal. A segunda fase teve como objetivo verificar a atividade antagonista “*in vitro*” de *Bifidobacterium breve* ao crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*. Na terceira fase, procurou-se verificar o efeito da concentração de bactérias bífidas ( $10^9$  UFC/ mL) ministradas diariamente aos ratos por 21 dias na translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço e a toxicidade oral crônica desses isolados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Probióticos e Saúde Humana

Segundo FULLER (1992), probióticos podem ser definidos como células microbianas vivas ingeridas pelo hospedeiro para obtenção de um efeito benéfico ao nível do ecossistema digestivo. Esses microrganismos são principalmente consumidos para manter e/ou promover o balanceamento da microbiota intestinal do hospedeiro, influenciando na transformação de moléculas e no estado fisiológico do mesmo (COLLINS & GIBSON, 1999).

Para serem efetivos, os microrganismos probióticos necessitam transpor várias barreiras até o local em que deverão atuar (HUIS IN'TVELD & SHORTT, 1996; FERREIRA, 2003). Alguns critérios gerais podem ser listados para seleção desses microrganismos candidatos ao uso de probióticos para humanos, sendo os principais: aspectos de segurança, funcionalidade e características tecnológicas. Os aspectos de segurança incluem origem da estirpe (deverá ser preferencialmente de origem humana e ser isolada do trato intestinal de indivíduos saudáveis), não ser patogênica e nem ter histórico de associação com doenças ou desordens intestinais, não deverá desconjugar sais biliares ou produzir substâncias tóxicas, não carrear genes de resistência a antibióticos e não translocar ou induzir translocação de microrganismos patogênicos (SAARELA, 2000). Dentre os aspectos funcionais, é desejável que as estirpes sejam tolerantes à bile, ácido clorídrico e ao suco gástrico, que possuam capacidade de aderir e colonizar o trato gastrointestinal, tenham atividade antagonística aos patógenos (*Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*) e promovam imunoestimulação, porém sem efeito próinflamatório (SAARELA, 2000, PERDIGON et al., 2001). Além disso, as estirpes não deverão promover a formação de “of flavor” no produto e resistirem às condições de processamento, mantendo sua atividade e viabilidade, para que no momento do consumo contenham números elevados do microrganismo probiótico (HUIS'T VELD & SHORTT, 1996, FERREIRA, 2003).

Os microrganismos mais comumente utilizados como probióticos são bactérias produtoras de ácido láctico tais como lactobacilli e bifidobacteria (KOPP-HOOLIHAN, 2001; FERREIRA, 2003). Ambos os grupos fazem parte da microbiota benéfica do intestino delgado e grosso, respectivamente e desempenham importante papel na manutenção de uma microbiota balanceada, por meio da síntese de bacteriocinas (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2003), peróxido de hidrogênio (AMANT et al., 2002), ácidos orgânicos (SERVIN, 2004) e na prevenção de várias doenças gastrointestinais (MITSUOKA, 1992; KOPP-HOOLIHAN, 2001). Estudos indicam resultados promissores de terapias utilizando esses microrganismos no tratamento e prevenção de doenças, como diarréias associadas ao uso de antibióticos e aquela provocada por *Clostridium difficile* (SAAVEDRA, et al., 1994) gastrites, úlceras gástricas e duodenal, provocadas por *Helicobacter pylori* (COLLADO et al., 2005b), artrites reumatóides, vaginites e infecções no trato urinário (HILTON, 1995) e inibição do desenvolvimento de *Salmonella sp*, *Shigella* e *Campylobacter jejuni* (PATHMAKANTHAN et al., 2002). A utilização de probióticos no tratamento e prevenção de doenças em crianças e recém-nascidos também tem mostrado bons resultados. ARROLA et al., (1999), demonstraram efeito benéfico de *Lactobacillus GG* (*Lactobacillus casei ssp rhamnosus*) no combate a diarréia provocada por *Clostridium difficile*, que pode ocorrer após terapia com antibióticos. O *Lactobacillus GG* também mostrou ter efeito positivo na resposta imune do hospedeiro (ISOLAURI et al., 2001) além de promover diminuição na resposta de hipersensibilidade de substâncias alergênicas em crianças (KALLIOMAKI et al., 2001). Pesquisas recentes têm demonstrado que probióticos podem ser efetivos não somente na prevenção de inflamações intestinais mais também podem estimular a resposta do sistema imunológico (PERDIGON et al., 2001). Estudos em crianças com eczema recebendo alimentos suplementados com probióticos mostraram benefícios na diminuição tanto dos distúrbios intestinais como na eczema (ISOLAURI, et al., 2000; KALLIOMAKI et al., 2001).

Além dos benefícios acima mencionados, probióticos também têm exercido efeitos positivos no aumento da utilização da lactose por indivíduos intolerantes (GRIFFIN et al., 2002), na diminuição do colesterol no sangue

(LIN & CHEN, 2000) e na prevenção do câncer de cólon (COMMANE et al., 2005).

Portanto, torna-se difícil deixar de reconhecer as evidências dos aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica e de seu metabolismo na nutrição e saúde do hospedeiro (MACKIE et al., 1999).

## **2.2. Importância de Bactérias Probióticas no Desenvolvimento da Microbiota Intestinal Benéfica**

O trato gastrointestinal abriga uma complexa microbiota com mais de 500 espécies bacterianas. Este é estéril quando nascemos, mas logo torna-se colonizado por microrganismos presentes no ambiente e na mãe (MITSUOKA, 1982). Cerca de 24 horas após o nascimento, as fezes da maioria dos recém-nascidos já contêm bactérias, tais como coliformes, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* em variadas proporções, que possuem o crescimento favorecido no início da colonização em função do potencial de oxido-redução positivo no intestino. Posteriormente, com a redução do oxigênio, o ambiente torna-se altamente reduzido e adequado ao crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, promovendo a proliferação de bifidobacterias, bacteróides e clostrídios (MACKIE et al., 1999).

De 3 a 4 dias após o nascimento, bactérias do gênero *Bifidobacterium* começam a proliferar, passando a predominar. Em resposta ao aumento dessas bactérias, coliformes, *Enterococcus* e bactérias putrefativas são restringidas e diminuem gradualmente, provavelmente pela redução de nutrientes utilizados em meio com baixo potencial de oxido-redução (MITSUOKA, 1978). A microbiota bacteriana se estabiliza a partir da primeira semana no trato intestinal de recém-nascidos, com predominância de bactérias bífidas, acreditando-se que essa predominância tenha efeito na prevenção de infecções intestinais (MITSUOKA, 1989).

Durante o desmame, quando uma dieta de adulto é introduzida na alimentação das crianças, uma microbiota bacilar, Gram negativa, semelhante a de adultos passa a predominar. O número de bifidobacteria diminui sendo ultrapassado por bacteróides, eubactéria e *peptostreptococi*. Com o passar do tempo, na terceira idade, a concentração de bifidobacteria

diminui ainda mais e alguns grupos indesejáveis como clostridia, incluindo *Clostridium perfringens* aumentam significativamente, assim como lactobacilli, *streptococci* e *enterobacteriaceae* (MITSUOKA, 1996).

As espécies de bactérias bifidas também sofrem alterações com o avanço da idade, onde as espécies de *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve*, que são típicas de recém-nascidos, são sucedidas por *Bifidobacterium adolescentis*. *Bifidobacterium longum* é uma espécie que perdura ao longo de toda a vida do hospedeiro sendo por isso uma das mais procuradas para integrar alimentos funcionais (MITSUOKA, 1990). Essas alterações são amplamente influenciadas pela composição da dieta alimentar da criança (leite materno x fórmulas) e também pela própria fisiologia do hospedeiro (MODLER, 1994).

### **2.2.1. Importância do Leite Materno no Desenvolvimento de Bactérias Bifidas no Intestino**

O leite humano é considerado o alimento ideal para o recém-nascido. Ele possui uma composição nutricional balanceada, contendo a quantidade certa de ácidos graxos, lactose, água e aminoácidos para a digestão humana, desenvolvimento mental e crescimento, e é suficiente para suprir todas as necessidades nutricionais do recém nascido durante os primeiros seis meses de vida (WILLIANS & STEHLIN, 2005). Este possui também cerca de 45 tipos diferentes de fatores bioativos que contribuem para o crescimento e desenvolvimento do bebê, bem como, para a maturação de seu trato gastrointestinal. Dentre estes destacam-se fatores antimicrobianos, agentes antiinflamatórios, enzimas digestivas e vários tipos de hormônios, fatores de crescimento e fatores bifidogênicos (KUNZ et al., 1999).

Os fatores bifidogênicos são compostos (geralmente hidratos de carbono), resistentes ao metabolismo direto do hospedeiro, que ao alcançarem o intestino serão metabolizados, preferencialmente, pelas bifidobacterias. Tais fatores podem ser incluídos no novo conceito de prebiótico, designação utilizada para os ingredientes não digeríveis, e que afetam de modo benéfico a saúde humana, por meio da estimulação do crescimento de um número limitado de bactérias do intestino (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Os fatores bifidogênicos mais utilizados são os

frutooligosacarídeos (FOS) de ocorrência natural (soja, trigo, milho, cebola e espargos), ou produzidos industrialmente a partir de xarope de sacarose; os frutanos com ligação  $\beta(2\rightarrow1)$ , tipicamente polidispersos com graus de polimerização que podem variar entre 2 e 35. Dentre os diversos FOS estudados, a oligofrutose tem mostrado efeito bifidogênico mais intenso (GOMES & MALCATA, 1999).

No leite materno, os fatores bifidogênicos estão presentes em concentrações significativas na forma de N-acetilglucosamina, oligômeros de glicose, galactose, fucose ou algumas glicoproteínas (COLLINS & GIBSON, 1999) que podem ser formados por meio da hidrólise da molécula de k-caseína pela tripsina e/ou quimiotripsina. Os açúcares e os polipeptídeos formados são responsáveis pela estimulação do crescimento de bactérias bífidas e conseqüente modulação da microbiota intestinal (ARUNACHALAM, 1999). MITSUOKA (1982) constatou maior predominância de bactérias bífidas ( $10^{10}$  a  $10^{11}$  UFC/g de material fecal) nas fezes, de crianças alimentadas com leite materno e menor concentração ( $10^8$  UFC/g) para coliformes, *Enterococcus* e *Lactobacillus*. Este mesmo autor constatou ainda que bactéria bífidas continuavam a predominar nas fezes de crianças alimentadas com fórmulas, porém o número de coliformes e bactérias anaeróbias era significativamente maior que aqueles encontrados para crianças alimentadas com leite materno. RENNE et al., (2005) também constataram maior contagem de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em crianças amamentadas quando comparadas com aquelas que receberam fórmulas. O leite materno, além de contribuir com fatores bifidogênicos, possui alto teor de lactose, e baixos teores de caseína e fosfato de cálcio que diminuem o poder tamponante do meio, favorecendo ainda mais o desenvolvimento de bactérias bífidas e conseqüentemente, criando condições desfavoráveis ao crescimento de patógenos (BEZIRTZOGLU, 1997).

### **2.2.2. Leite Materno e seu Papel na Saúde da Criança**

O leite materno é espécie-específico, fazendo-o unicamente superior para a alimentação infantil. As fórmulas infantis tendem a ser mais energéticas, mas não necessariamente mais saudáveis. Bebês alimentados com leite materno tendem a ter menor incidência de doenças, devido a



transferência de anticorpos da mãe. Aproximadamente 80% das células do leite materno são macrófagos (WILLIANS & STEHLIN, 2005). Crianças alimentadas com leite materno possuem menor incidência de doenças infecciosas, tais como meningite bacteriana, bacteremia, diarreias, infecções no trato respiratório, enterocolites necrosantes, otite, infecções no trato urinário, leucemia, obesidade (SINGHAL et al., 2002), hipercolesterolemia, asma (CHULADA et al., 2003), quando comparados àqueles que não foram amamentados.

O leite humano mostrou *in vitro* atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (Grupo B e D) e *Haemophilus influenzae*, importantes causadores de doenças infantis. Este também inibiu enterotoxinas produzidas por *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*, neutralizou toxinas de *Clostridium difficile* (KIM et al., 1984) e inibiu o crescimento do vírus da herpes (YOLKEN et al., 1992). Estudos sugerem o papel dos ácidos graxos e o complexo de mucinas associado com os glóbulos de gordura do leite humano em sua atividade antiviral (YOLKEN et al., 1992).

O leite materno também tem mostrado resultados promissores na diminuição do curso da doença causada pelo vírus HIV. Em seus estudos TOZZI et al., (1990) constataram que crianças alimentadas com fórmulas desenvolveram a Aids mais rapidamente (9,7 meses) do que aquelas que receberam leite materno (19 meses). COUTSODIS et al., (2003) constataram em suas experimentações desenvolvidas na África, que a alimentação exclusiva com leite materno nos primeiros 6 meses de vida de mãe HIV positivo não aumentou o risco da transmissão do vírus para a criança. Entretanto, crianças que receberam leite materno e fórmulas tiveram uma taxa aumentada de infecção. Uma possível explicação para o ocorrido, seria a maior sensibilidade do vírus HIV a pH muito baixo e crianças alimentadas exclusivamente com leite materno tem ambiente intestinal ácido, pelo acúmulo de ácido acético na forma de tampão acetato. A introdução de produtos alimentícios diminui ou inibe o aparecimento e estabelecimento desse sistema tampão, aumentando o pH do intestino, facilitando, a sobrevivência do vírus no trato intestinal (ARNOLD, 1993).

### **2.2.3. Bancos de Leite Humano**

Devido aos inúmeros benefícios conferidos pelo leite materno às crianças e recém nascidos (sadios e/ou prematuros) e pelo fato de muitas mães serem privadas, pelos mais diferentes motivos, de amamentarem seus filhos é que os bancos de leite humano vêm crescendo e se tornando prática corrente em muitos países (GIUGLIANI, 2002).

Os bancos de leite humano (BLH) são centros especializados, obrigatoriamente vinculados a um hospital materno e/ou infantil, responsáveis pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou de nutricionista (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O Brasil é referência mundial em Bancos de Leite Humano e possui a maior e mais bem estruturada rede (GIUGLIANI, 2002), que atualmente conta com mais de 186 unidades espalhadas por todo o país.

Como evidenciado em literatura, o leite humano pode ser facilmente contaminado por fontes externas, bem como carrear agentes infecciosos e substâncias nocivas, transmitidas via sistêmica, incluindo bactérias, vírus, medicamentos e drogas utilizadas pelas nutrizes (MAY, 1998). Dentre as substâncias químicas potencialmente perigosas veiculadas pelo o leite humano estão incluídos os medicamentos (ou seus metabólicos) utilizados pela nutriz, substâncias neurotóxicas, como a nicotina, a cafeína e o álcool, além das drogas ilícitas, como a cocaína e a heroína (GOLDING, 1997). Com relação à contaminação por vírus, têm sido relatadas a transmissão vertical de agentes de infecção no leite humano, ainda que este carregue também componentes específicos de defesa para a criança. Dentre estes, destacam-se a transmissão citomegalovírus, vírus da leucemia da célula T humana, vírus da hepatite B e C, vírus da rubéola e o vírus da herpes humano (GOLDING, 1997). O maior foco de atenção quanto à transmissão viral, entretanto, incide sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Apesar das evidências acumuladas sobre o fato, grande discussão tem ocorrido por correntes distintas, considerando os prós e contras da

amamentação por mães soropositivas e os riscos que elas constituem para bancos de leite humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION –WHO, 1992).

Por ser facilmente contaminado e veículo de várias doenças infecciosas, os bancos de leite tomam uma série de medidas de segurança para garantirem a qualidade e inocuidade da matéria prima neles depositadas. Além de fazer uma seleção rigorosa das doadoras com relação a alguns hábitos de vida e exames (hepatite B e C, HIV, tuberculose, etc), todo o leite é pasteurizado (62,5°C-65°C/30 minutos). Esse processo garante a eliminação de bactérias e vírus, potencialmente patogênicos, inclusive o vírus da Aids. Após o tratamento térmico o leite é congelado e submetido a testes de controle microbiológico, para checar a efetividade da pasteurização (ARNOLD & LARSON, 1993)

A pasteurização embora necessária, afeta algumas características nutricionais e imunológicas do leite (ARNOLD & LARSON, 1993; BORBA et al., 2003). ARNOLD & LARSON (1993) verificaram uma redução de 1,4%, 22%, 51%, 57% e 100% respectivamente nos teores de fosfatase, lactoferrina, Imunoglobulina A, ácido fólico e lisozima no leite após a pasteurização. BORBA et al., (2003) avaliaram o efeito do processo de pasteurização do leite sobre o crescimento, *in vitro*, de bifidobactérias de origem humana, em leite humano e constataram que o leite materno pasteurizado apresentou efeito inibidor no crescimento das espécies de *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 29521), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15707) e *Bifidobacterium breve* (UFVCC 1108), enquanto no leite cru o crescimento foi estimulado.

Apesar da redução de alguns componentes no leite pela pasteurização adotada nos bancos e por este não conter a imunidade passiva da própria mãe, os bancos de leite têm desempenhado um papel significativo na sobrevivência infantil ao longo dos anos (LAWRENCE & LAWRENCE, 1999). Embora haja grandes avanços nas fórmulas infantis, o leite humano continua sendo o único alimento adequado para crianças (WORK GROUP ON BREASTFEEDING, 1997), e os fatores imunológicos e nutricionais presentes nele, raramente poderão ser industrializados. Para crianças prematuras, leite oriundo dos bancos de leite tem mostrado ser tão

protetor quanto o leite da própria mãe contra enterocolites necrozantes (LUCAS & COLE, 1990).

Uma possível forma de compensar a inativação dos fatores bifidogênicos pela pasteurização, uma vez que o tratamento térmico é um procedimento necessário, seria a adição direta de bactérias bífidas no leite pasteurizado nos bancos. Assim, as crianças ao invés de ingerir os fatores que estimulariam o crescimento de bactérias bífidas no intestino receberiam a espécie probiótica na alimentação diária (BORBA et al., 2003). Esse gênero favorece o estabelecimento de uma microbiota intestinal balanceada que confere proteção especialmente frente às infecções entéricas (KOPPHOOLIHAN, 2001). Essas infecções constituem uma causa freqüente de morbi-mortalidade de recém-nascidos, especialmente nos países em desenvolvimento (VIEIRA et al., 2003).

#### **2.2.4. Bactérias Bífidas**

As bifidobacterias foram primeiramente isoladas no final do século XIX por Tissier, sendo, caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbios (SGORBATI et al., 1995). No que diz respeito à sua morfologia, podem ter várias formas que incluem bacilos curtos e curvados, que variam do formato uniforme ao ramificado, bifurcado em formas de Y ou V (TANNOCK, 1999). São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO<sub>2</sub>, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica é a frutose-6-fosfato fosfoacetolase, a qual pode por isso ser usada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies. Além da glucose, todas as bifidobacterias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono (GOMES & MALCATA, 1999). Estudos realizados por CROCIANI et al., (1994) mostraram a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar carboidratos complexos. O pesquisador avaliou 290 estirpes de 29 espécies de bifidobacterias de origem animal ou humana, e constatou que D-galactosamina, D-glucosamina, amilose e amilopectina foram os

substratos fermentados pela maior parte das espécies. A *Bifidobacterium infantis* foi a única espécie capaz de fermentar o ácido D-glucurônico, enquanto estirpes de *B. longum* fermentaram a arabinogalactana, bem como a goma arábica.

A temperatura para a qual se registra crescimento ótimo oscila entre os 37 e 41°C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45°C e 25-28°C, respectivamente. Em relação ao pH, o ótimo de bactérias bífidas verifica-se valores entre 6 e 7, com ausência de crescimento a valores de pH ácidos, entre 4,5 e 5,0 ou alcalinos, entre 8.0 e 8.5 (SCARDOVI, 1986).

### **2.2.5. Efeitos Benéficos Conferidos por Bactérias Bífidas**

Durante as últimas décadas, o número de pesquisas relacionadas aos efeitos benéficos de bifidobactérias usando diferentes formulações e com numerosas propostas de prevenir doenças tem aumentado. Estudos mostram a eficiência dessas bactérias na prevenção de desordens intestinais e vários outros fatores, tais como, melhoria no quadro clínico de pacientes com doenças hepáticas (SCARDOVI, 1986), prevenção de constipação (TANAKA & SHIMOSAKA, 1982), redução do risco de câncer de cólon (COMMANE et al., 2005), efeito anti-tumor (SREEKUMAR & HOSONO, 2003), melhoria no metabolismo de proteínas e vitaminas (ARUNACHALAM, 1999; YOUNG & HUFFMAN, 2003), bem como estimulação do sistema imune (KALLIOMAKI et al., 2001; ISOLAURI, 2001). Além disso, resultados promissores têm sido alcançados pelo uso dessas bactérias no controle de doenças em crianças e recém nascidos. SAAVEDRA et al., (1994) e SZAJEWSKA & MRUKOWICZ (2001) mostraram benefícios provocados por *Bifidobacterium bifidum* associada a *S. thermophilus* e *Lactobacillus* GG na prevenção de diarreia nosocomial em crianças. *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus* GG (DUNGGAN et al., 2002) e *Bifidobacterium bifidum* (SAAVEDRA et al., 1994), foram efetivos na prevenção de diarreias agudas em crianças hospitalizadas tratadas com antibióticos. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis* diminuíram a incidência de enterocolites necrosantes em recém-nascidos em tratamento intensivo (HOYOS, 1999). ARAKI et al., (1999) observaram um aumento na concentração de imunoglobulina A (Ig A) anti-rotavirus e uma

diminuição na população de rotavirus em crianças que ingeriram *Bifidobacterium breve*.

### **2.3. Segurança dos Microrganismos Probióticos**

Os inúmeros benefícios conferidos por bactérias probióticas, tem levado à busca de novas estirpes para uso em alimentos e produtos farmacêuticos (KLEIN et al., 1998). Bactérias bífidas e lactobacilos têm longa história de uso seguro na dieta humana e animal (SHORTT, 1999). Entretanto, nos últimos anos, alguns relatos têm identificado bactérias do ácido láctico probióticas com patologias clínicas (ISHIBASHI & YAMAZAKI, 2001). Situações patológicas em que a presença dessas estirpes foram identificadas, são raras e estimadas em 0,05% - 0,4% dos casos de endocardites e bacteremia. No entanto, é pouco provável que esses microrganismos sejam os agentes causadores dessas enfermidades (GASSER, 1994).

Essas ocorrências aumentaram o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes que estão sendo introduzidas na cadeia alimentar humana. Aspectos de segurança, como patogenicidade, infectividade e fatores de virulência, incluindo toxicidade, atividade metabólica, resistência à antibióticos e algumas propriedades intrínsecas do microrganismo, devem ser avaliados.

A verificação da susceptibilidade antimicrobiana de novos isolados visa prevenir a indicação de estirpes resistentes a antibióticos e a possibilidade de disseminação dessa resistência para microrganismos patogênicos no trato intestinal do hospedeiro comensal (AUSTIN et al., 1999; ROBREDO et al. 2000), uma vez que uso indiscriminado de antimicrobianos por humano e animais, bem como o uso desses agentes como promotores de crescimento têm promovido a seleção de estirpes resistentes causando sérios problemas no tratamento de infecções microbianas. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida. Resistência intrínseca é baseada nas características naturais do microrganismo, como fisiologia e peculiaridades estruturais da estirpe (características da parede celular ou perda da função ativa do antibiótico), sendo pouco provável de ser transmitida para outros

microrganismos, não representando risco de disseminação do gene. A resistência adquirida é oriunda de mutações ou aquisição de DNA de outras bactérias, como por exemplo de plasmídeos, que podem ser facilmente transmitidos para outros microrganismos no trato gastrointestinal (WRIGHT, 2005).

Outro aspecto de segurança recomendado é a verificação da toxicidade da estirpe, constatada de forma indireta por meio do crescimento anormal de alguns órgãos e por sua capacidade de translocar para sítios extra-intestinais ou de induzir translocação da microbiota intestinal endógena (ZHOU et al., 2000a).

A especificidade do probiótico é outro fator que deve ser levado em consideração. Probióticos que se destinam à espécie humana devem ser isolados da microbiota de indivíduos saudáveis e aqueles que se destinam a animais conseqüentemente devem ser isolados da respectiva espécie (BORRIELLO et al., 2003).

### **2.3.1. Sensibilidade a Antibióticos**

Antibióticos são substâncias químicas que possuem atividade bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos. Podem ser produzidos por bactérias ou fungos, e sintetizados, total ou parcialmente. Atualmente, os antibióticos estão entre as drogas mais utilizadas em terapêutica, tanto em nível ambulatorial quanto hospitalar. Além de perturbar o equilíbrio das populações da microbiota normal, o emprego indiscriminado destas drogas provoca também, o desenvolvimento de resistência bacteriana e, conseqüentemente, o surgimento de infecções por microrganismos multirresistentes (SILVA, 1999). Por esse motivo, cada vez mais torna-se necessário o conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais freqüentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência (TOSIN, 2001). Um grande número de bactérias possui resistência intrínseca a vários grupos de antibióticos. As mutações podem também originar formas resistentes (BARBOSA et al., 1998). Os mecanismos genéticos que codificam a resistência bacteriana se exteriorizam por meio da inativação do antibiótico pela modificação de sua estrutura química ativa (produção de enzimas  $\beta$ -lactamases), modificação

específica do sítio alvo (mutagênese, como por exemplo nas *Penicillin-binding-protein*), prevenção do antibiótico de alcançar seu sítio alvo, por meio da diminuição de sua absorção (alterações na permeabilidade da membrana ou modificações nas proteínas de membrana), ou mais comumente no efluxo da substância ativa do antibiótico (WALSH, 2000). Essas modificações podem ser transmitidas ao longo de gerações, por meio de mecanismos de transferência de material genético, tais como: conjugação (transferência de genes exige o contato célula-célula, diferindo dos demais processos), transformação (captação de DNA solúvel do meio por células doadoras), transdução (transferência genética auxiliada por bacteriófagos) e transposição (genes são transferidos dentro de uma mesma célula por meio dos transposons) (TAVARES, 2001). Na transposição, os segmentos podem "saltar" ou se auto-transferirem de uma molécula de DNA (plasmídeo, cromossomo) para outra (plasmídeo, cromossomo, fago) (TORTORA et al., 2000). A transferência de fragmentos de DNA cromossômico e de plasmídeos é altamente disseminada nos procariotos, sendo uma das causas da notável diversidade genética observada nas bactérias (BARBOSA et al., 1998). A transferência de plasmídeos ocorre tanto entre células bacterianas de uma mesma população quanto entre as bactérias de diferentes gêneros (TORTORA et al., 2000), agravando ainda mais o problema da resistência. Essa rápida propagação de resistência a antibióticos tem sido observada em populações bacterianas após uso indiscriminado dos antibióticos em ambientes comunitários e hospitalares (BROOKS et al., 2000). Além da seleção de patógenos resistentes, os antibióticos podem promover um desbalanceamento da microbiota intestinal do hospedeiro, favorecendo o surgimento de infecções no trato gastrointestinal. Alguns autores sustentam que, em casos de co-administração com antibióticos para prevenir ou tratar distúrbios intestinais, os probióticos deveriam ser resistentes a certos antibióticos para sobreviverem no trato gastrointestinal (DANIELSEN & WIND, 2003). Entretanto, essa prática é discutível. Estudos têm mostrado efeitos benéficos de microrganismos probióticos como adjuvante no tratamento de infecções e outros distúrbios intestinais em adultos, crianças e recém nascidos.



A determinação da susceptibilidade antimicrobiana de uma estirpe probiótica é um importante pré-requisito para sua aprovação.

### **2.3.1.1. Principais Classes de Antibióticos**

Os antibióticos diferem entre si quanto às propriedades químicas, seus espectros e mecanismos de ação e são classificados quimicamente como: derivados de aminoácidos, açúcares, acetatos, propionatos, entre outros (TAVARES, 1990). Os antibióticos podem agir inibindo a síntese da parede celular ( $\beta$ -lactâmicos, bacitracina, novobiocina e vancomicina), a síntese protéica (aminoglicosídeos e macrolídeos), promovendo alterações na membrana celular (polimixina), e impedindo a duplicação do cromossomo (PAIVA NETTO, 1989).

#### **2.3.1.1.1. Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos**

Os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos compartilham o anel central  $\beta$ -lactâmico que possui quatro elementos, sendo seu principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular. Estruturas anelares adicionais ou grupos substituintes acrescentados ao anel  $\beta$ -lactâmico determinam se o agente é penicilina, cefem (cefalosporina), carbapenem, ou monobactam.

##### **2.3.1.1.1.1. Penicilinas**

Descoberta por Fleming em 1929, a penicilina foi o primeiro antibiótico a ser usado. É naturalmente obtida por fermentação do *Penicillium notatum* (*P. notatum*) e permanece como um excelente antimicrobiano (GOODMAN & GILMAN, 1991). A partir da descoberta do seu núcleo central, uma série de derivados foram obtidos em laboratório, que constituíram o grupo das penicilinas semi-sintéticas. Embora seu mecanismo de ação ainda não tenha sido completamente elucidado, a atividade bactericida inclui a inibição da síntese da parede celular e a ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria. Age sobre o peptídeoglicano na parede celular dos microrganismos inibindo as enzimas que fazem a ligação entre as cadeias peptídicas, impedindo o desenvolvimento da estrutura normal do peptidoglicano, tornando a parede celular mais frágil e susceptível à lise. Estas enzimas (transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase) localizam-se logo abaixo da parede celular e são denominadas de "proteínas ligadoras de penicilina"

(*penicillin-binding proteins* – PBPs). A capacidade de penetrar na parede celular e o grau de afinidade destas proteínas com a penicilina determinam a sua atividade antibacteriana. Os microrganismos Gram-positivos são mais sensíveis a esse grupo de antibióticos (GOODMAN & GILMAN, 1991).

As penicilinas podem ser classificadas como penicilinas naturais e semi-sintéticas (PAIVA NETTO, 1989). As naturais (penicilina G e penicilina V) são extraídas de cultura do fungo *P. notatum* e existem sob várias formas relacionadas. Possuem algumas desvantagem tais como, o baixo espectro de atividade e a sensibilidade as penicilinases (enzimas produzidas por bactérias, especialmente espécies de estafilococos, que rompem o anel  $\beta$ -lactâmico da molécula da penicilina). Assim, numa tentativa de minimizar as desvantagens acima descritas, penicilinas semi-sintéticas de amplo espectro têm sido desenvolvidas em laboratório pela adição de diferentes radicais à estrutura original das penicilinas naturais. São divididas em três grupos: penicilinas semi-sintéticas antiestafilocócicas (oxacilina), as de amplo espectro (ampicilina e amoxicilina) e as de curto espectro (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). As Figuras 1 e 2, indicam, respectivamente, a estrutura química das penicilinas naturais e semi-sintéticas.

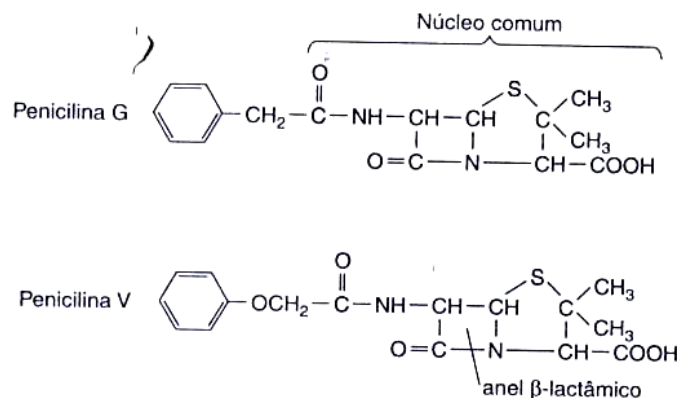


Figura 1: Penicilinas naturais (TORTORA et al., 2000).

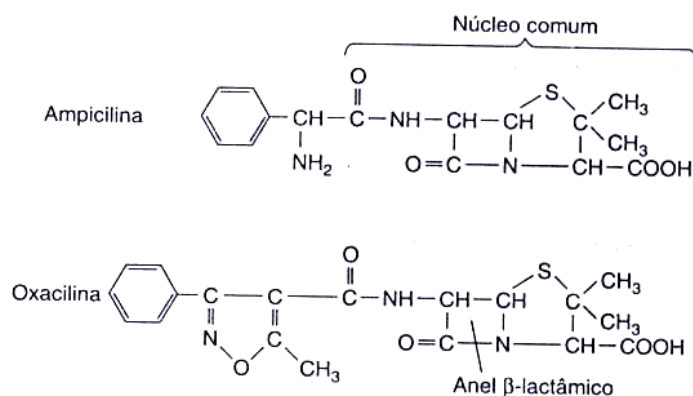
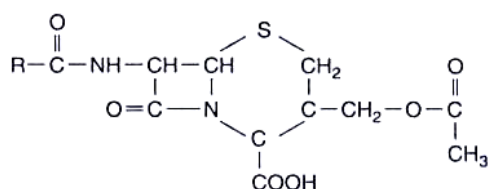


Figura 2: Penicilinas semi-sintéticas (TORTORA et al., 2000).

### 2.3.1.1.2. Cefens (cefalosporina).

Os cefens são agentes antimicrobianos que possuem um espectro de atividade ligeiramente diferente contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa classe antimicrobiana inclui as cefalosporinas clássicas, assim como os agentes nas subclasses cefamicina, oxacefem e carbacefens. As cefalosporinas (Figura 3) são antibióticos enquadrados dentro do conceito de drogas betalactâmicas, pois possuem similaridade estrutural com as penicilinas (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Apesar dessa similaridade, as cefalosporinas são resistentes a  $\beta$ -lactamases, que inativam penicilinas, sendo uma alternativa efetiva no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a este agente antimicrobiano (CHRISTIAN & CHRISTIAN, 1997). As  $\beta$ -lactamases são enzimas frequentemente produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, que lisam o anel betalactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico (JUNIOR et al., 2004). As cefalosporinas são classificadas como cefalosporinas de primeira, segunda, terceira, ou quarta geração, com base numa sequência cronológica (PAIVA NETTO, 1989). Nem todos os representantes de um determinado grupo ou geração possuem necessariamente o mesmo espectro de atividade. As cefalosporinas de primeira geração (cefalotina e cefalexina) apresentam boa atividade contra bactérias Gram-positivas e menor atividade contra os microrganismos Gram-negativos. Exceção feita aos enterococcos, *Staphylococcus aureus*

metilino-resistente e *Staphylococcus epidermidis*, que são susceptíveis a elas. As cefalosporinas de segunda geração têm maior atividade contra microrganismos Gram-negativos, embora com menor intensidade do que aquelas apresentadas pelas de terceira geração. Já as cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona) geralmente são menos ativas contra microrganismos Gram-positivos, se comparadas às de primeira geração. São mais eficazes, no entanto, contra microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, incluindo as estirpes produtoras de betalactamase. As cefalosporinas de quarta geração têm maior espectro quando comparadas às de terceira geração. Além disso, apresentam maior estabilidade diante da hidrólise mediada por betalactamases cromossômicas ou daquelas transmitidas por plasmídeos (PAIVA NETTO, 1989).



Núcleo da cefalosporina

Figura 3: Estrutura química da Cefalosporina.

### 2.3.1.1.1.3. Carbapenêmicos

A estrutura dos carbapenêmicos (imipenem, panipenem, meropenem, ertapenem) diferem pouco da estrutura das penicilinas. São mais resistentes à hidrólise por  $\beta$ -lactamase, o que lhes conferem atividade de amplo espectro contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BUYNAK, 2005). A Figura 4 indica a estrutura química do meropenem.

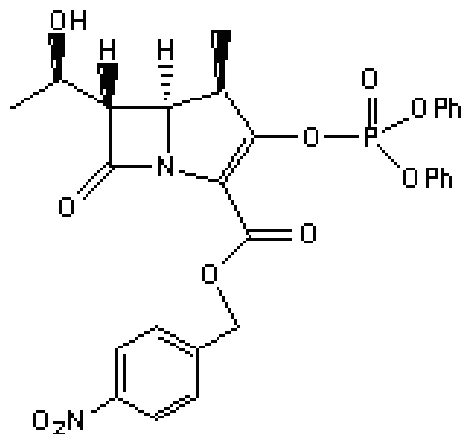


Figura 4: Estrutura química do meropenem.

#### 2.3.1.1.4. Monobactanos

Os agentes antimicrobianos monobactanos são  $\beta$ -lactâmicos monocíclicos. Atualmente, o aztreonam (ativo contra as bactérias gram-negativas aeróbicas) é o único antibiótico monobactâmico liberado para uso pelo FDA (Food Drug and Administration United States). A Figura 5 indica a estrutura do aztreonam.

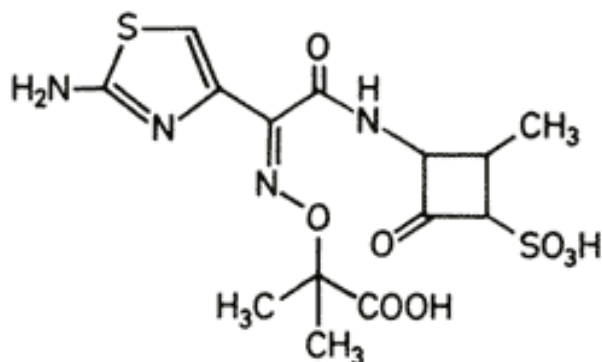


Figura 5: Estrutura química do aztreonam.

#### 2.3.1.1.2. Antibióticos Glicopeptídicos

Os agentes antimicrobianos glicopeptídicos, como por exemplo a vancomicina (Figura 6), possuem estrutura química comum, e seu principal modo de ação é a inibição da síntese da parede celular num sítio diferente daquele dos  $\beta$ -lactâmicos. A vancomicina forma um complexo com a região D-Ala-D-Ala do precursor do peptidoglicano. O complexo formado impede a

transglicosilação do precursor dissacárido-peptídico com a cadeia de peptidoglicano. Como consequência, há um acúmulo de precursores no citoplasma e na membrana citoplasmática unidos ao lipídio transportador. A vancomicina não penetra no citoplasma e só atua com a parte terminal do peptídeo quando o precursor é deslocado pelo peptídeo transportador até a região externa da membrana citoplasmática. A vancomicina, além de impedir a transglicosilação, também inibe a transpeptidação destes precursores ao bloquear o sítio de ataque das transpeptidases e carboxipeptidases. A vancomicina é principalmente ativa contra bactérias Gram positivas (GOODMAN & GILMAN, 1991). Os microrganismos Gram-negativos são naturalmente resistentes a esta droga.

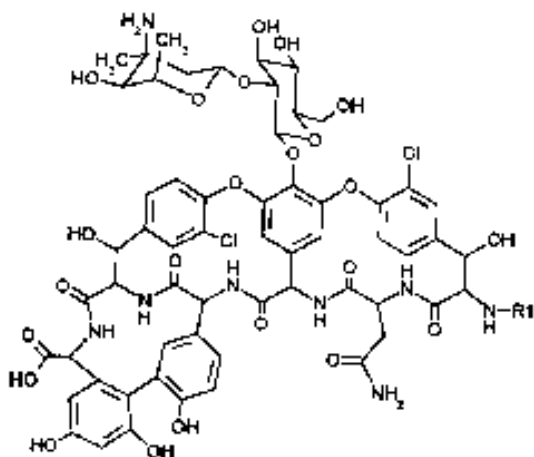
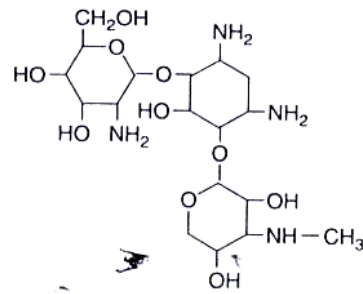


Figura 6: Estrutura química da vancomicina.

### 2.3.1.1.3. Antibióticos Aminoglicosídicos

Os aminoglicosídicos formam um importante grupo de antibióticos, dos quais se destacam a estreptomicina, gentamicina (Figura 7), amicacina, tobramicina, sisomicina, canamicina, neomicina e netimicina (PAIVA NETTO, 1989). São bactericidas que agem interferindo na síntese protéica bacteriana em nível de ribossomo, promovendo a formação de proteínas defeituosas (GOODMAN & GILMAN, 1991). A classe inclui membros que são afetados, de diferentes formas, pelas enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos, o que resulta em algumas diferenças de espectro entre os diversos agentes. A gentamicina se liga de forma irreversível à proteína S12 da unidade ribossômica 30S. A entrada destas drogas nas células procariontes é  $O_2^-$

dependente, fato este que explica a resistência natural das bactérias anaeróbias estritas. Este mecanismo de entrada pode ser bloqueado ou inibido por cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . A ação bactericida dos aminoglicosídeos se deve a dois fatores: inibem a síntese protéica e provocam erros de leitura do RNAm. Este antimicrobiano é utilizado no tratamento de infecções entéricas causadas por bactérias Gram negativas.



Gentamicina

Figura 7: Estrutura do antibiótico gentamicina (TORTORA 2000).

#### 2.3.1.1.4. Macrolídeos

Os antibióticos macrolídicos, como por exemplo a eritromicina (Figura 8), são caracterizados pela presença de um anel lactona macrocíclico em sua estrutura química e apresentam um espectro de ação limitado. (GOODMAN & GILMAN, 1991). Age impedindo a síntese protéica por meio da ligação à subunidade 50S do ribossomo 70S, bloqueando o movimento de translocação do ribossoma ao longo do RNAm. São ativos contra a maioria das bactérias Gram-positivas e possuem boa atividade contra bactérias anaeróbias, sendo bacteriostáticos. Entretanto, não conseguem penetrar a parede celular da maioria dos bacilos Gram-negativos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Seu espectro de atividade é semelhante ao da penicilina G constituindo uma droga alternativa a este antimicrobiano (TORTORA et al., 2000).

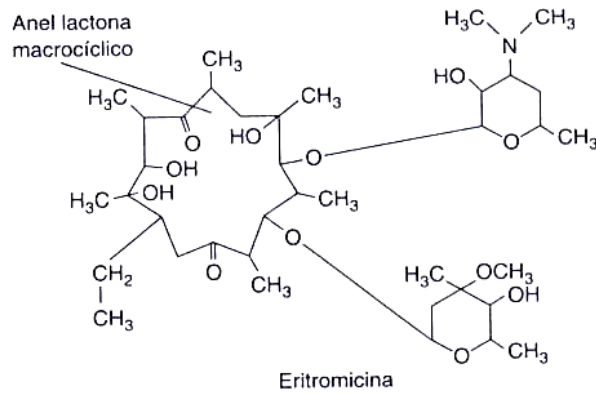


Figura 8: Estrutura do antibiótico eritromicina (TORTORA et al., 2000).

### 2.3.1.1.5. Sulfonamidas

São agentes antimicrobianos, bacteriostáticos e em altas concentrações possuem efeito bactericida, mas nessas condições, podem causar graves reações adversas ao hospedeiro. Inibem o crescimento bacteriano, interferindo na utilização do ácido p-aminobenzóico (PABA) pelos microrganismos. O PABA é o substrato para uma reação enzimática que leva à síntese do ácido fólico, que funciona como co-enzima para síntese de vários aminoácidos e de bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos. Na presença da sulfonamida (análogo estrutural do PABA), a enzima que normalmente converte o PABA em ácido fólico, combina com a droga. Essa combinação interrompe a síntese do ácido fólico e impede o crescimento do microrganismo (TORTORA et al., 2000). De uma maneira geral, apresentam amplo espectro de ação, atingindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os microrganismos que não requerem ácido fólico para o crescimento ou que podem usar o ácido fólico pré-formado são, portanto, resistentes às sulfonamidas (PAIVA NETTO, 1989). A Figura 9 mostra a comparação das estruturas do PABA e da sulfonamida.



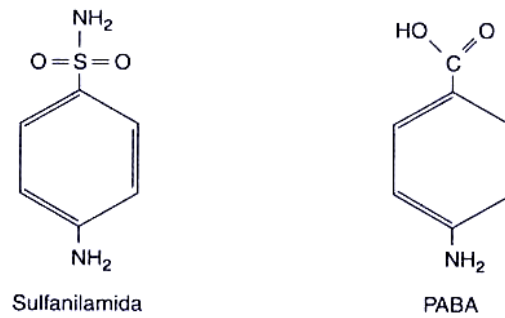


Figura 9: Comparação entre as estruturas do PABA e da sulfonamida (TORTORA et al., 2000).

As bactérias probióticas, devido à sua diversidade, podem apresentar susceptibilidade variável aos diferentes tipos de antibióticos. Essa susceptibilidade deve ser conhecida e avaliada no processo de seleção de probióticos para uso humano ou animal.

### 2.3.2. Antagonismo de Bactérias Probióticas sobre Patógenos

Para ter impacto sobre a microbiota colônica é importante para a estirpe probiótica mostrar antagonismo sobre bactérias patogênicas de forma a criar um ambiente desfavorável para o crescimento desses microrganismos, e conseqüentemente proteger o hospedeiro de doenças (SAARELA et al., 2000). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o efeito inibitório exercido por bactérias probióticas. No caso de Lactobacilli e bifidobacterias por exemplo, o desvaforescimento local é promovido pela produção de ácidos orgânicos (acético e láctico) e conseqüente diminuição do pH, competição por nutrientes e sítios de adesão, estimulação do sistema imune do hospedeiro e produção de substâncias antimicrobianas específicas, tais como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio dentre outras (SERVIN, 2004).

#### 2.3.2.1. Produção de ácidos orgânicos

Lactobacilli e bifidobacterias produzem metabólitos, tais como ácidos acético e láctico, os quais possuem efeito inibitório no crescimento de microrganismos patogênicos (SERVIN, 2004). Esse efeito está relacionado com a redução do pH (que promove acidificação do citoplasma celular e conseqüente perda da homeostase) e com a forma não dissociada do ácido

(PODOLAK et al., 1996), que sendo lipofílica difunde-se passivamente através da membrana (KASHKET, 1987) promovendo colapso do gradiente protoeletroquímico. Assim, há interrupção do sistema de transporte de substrato para a célula (SNIJDERS et al., 1985) e comprometimento das funções metabólicas do microrganismo. O ácido acético exerce maior efeito inibitório que o ácido láctico para um mesmo valor de pH, devido ao seu pKa do ácido acético (pKa=4,76) ser mais elevado do que o do ácido láctico (pKa=3,86) resultando em maior concentração da forma não dissociada no citoplasma bacteriano (VASSEUR et al., 1999). Os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácticas probióticas atuam antagonizando patógenos.

LEHTO & SALMINEM, (1997) verificaram que *Lactobacillus casei subsp. rhammnosus* GG impediu a invasão das células intestinais Caco-2 por *Salmonella enterica serovar typhimurium* porém, quando o meio foi neutralizado para pH 7 essas células foram invadidas pelo patógeno sugerindo assim que o efeito inibitório era pH-dependente. FORESTIER et al., (2001) constataram a inibição de *Escherichia coli enterotoxigênica* (ETEC), *Escherichia coli enteropatogênica* (EPEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Clostridium difficile* pelo sobrenadante livre de células de *Lactobacillus casei subsp. rhammnosus* (LCr-35). *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei subsp. rhammnosus* e *Bifidobacterium bifidus* inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori in vitro*, pela produção de ácido láctico e acético (MIDOLO et al., 1995). Estirpes de *Lactobacillus casei shirota* ou *Lactobacillus acidophilus* reduziram o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 pela produção de ácido láctico e redução do pH (OGAWA et al., 2001). STRUS et al., (2001) constataram ainda que estirpes de *Lactobacillus sp.* isolados do trato digestivo inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* que são agentes etiológicos de infecções gastroentéricas.

ALAKAMI et al., (2000) verificaram *in vitro* que as substâncias antibacterianas secretadas por *Lactobacillus plantarum* (VIIE-78076) inibiam o crescimento de *Pantoea agglomerans* e *Fusarium avenacerum* e que essas eram mais ativas na presença de ácido láctico. O ácido láctico agiu permeabilizando a membrana externa das bactérias Gram-negativas

permitindo que outras substâncias antimicrobianas penetrassem, aumentando a susceptibilidade do patógeno a essas moléculas.

Os ácidos orgânicos em particular ácido acético e láctico possuem efeito inibitório contra bactérias Gram-negativas. Entretanto, somente poucos autores sugerem que a produção desses ácidos é o fator responsável para a atividade antagonística de bifidobactérias (FOOKS & GIBSON, 2003).

#### **2.3.2.2. Produção de bacteriocinas e/ou moléculas semelhantes à bacteriocinas**

Bacteriocinas são compostos antimicrobianos de origem proteica, produzidos por bactérias e que são ativos geralmente contra espécies intimamente relacionadas com a cepa produtora (TAGG et al., 1976; KLAENHAMMER, 1988). Entretanto, algumas bacteriocinas são capazes de inibir o crescimento de microrganismos filogeneticamente distantes, como por exemplo *Clostridium botulinum*, *Bacillus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (TICHACZEK et al., 1992). Foram primeiramente caracterizadas em bactérias Gram-negativas, sendo as colicinas (*Escherichia coli*) as mais estudadas (LAZDUNSKI, 1988). Posteriormente, foi constatado que essas moléculas também eram produzidas por bactérias Gram-positivas e dentro dessa classe, as bactérias do ácido láctico têm sido amplamente exploradas para utilização de suas bacteriocinas na conservação de alimentos (CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas agem promovendo colapso do potencial de membrana por meio de ligações eletrostáticas com os fosfolípidos (carregados negativamente). Essas ligações são favorecidas uma vez que a maioria das bacteriocinas são anfifílicas e catiônicas. Após ligação, a porção hidrofóbica da bacteriocina se insere para dentro da membrana formando poros. A formação desses poros permitem a saída de íons, principalmente potássio e magnésio, promovendo dissipação da força protomotora, comprometendo a síntese de macromoléculas e produção de energia, resultando em morte celular (MONTVILLE et al., 1995).

Lactobacilos e bifidobactérias são microrganismos capazes de produzir bacteriocinas e essas substâncias têm sido citadas por

pesquisadores como responsáveis pela inibição do crescimento de várias bactérias patogênicas em experimentação realizadas *in vitro*. COCONNIER et al., (1997) constataram que o sobrenadante livre de células da cultura de *Lactobacillus acidophilus* diminuiu a velocidade de crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Estirpes de *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* produziram substâncias antibacterianas (não identificadas mas distintas de ácido lático), que inibiram *in vitro* patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* (BERNET-CAMARD et al, 1997). O crescimento de *Giardia intestinalis* e sua ligação à células Caco-2 do epitélio intestinal foi significativamente reduzido por substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (La1) produzidas por *Lactobacillus johnsonii* (PEREZ et al., 2001). MICHETTI et al., (1999) constataram que *Lactobacillus acidophilus* produziu substâncias antibacterianas que reduziram a viabilidade de *Helicobacter pylori in vitro*. A colonização do trato gastrointestinal de ratos por esse mesmo microrganismo patogênico foi inibida por *Lactobacillus salivarius* (KABIR et al., 1997).

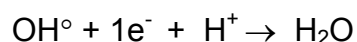
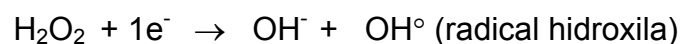
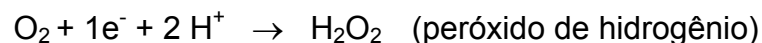
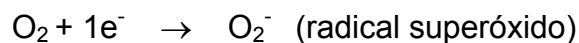
Bactérias bífidas desempenham importante papel na proteção contra gastroenterites pela inibição de microrganismos patogênicos intestinais. GIBSON & WANG (1994) descreveram atividade antibacteriana de estirpes de *Bifidobacterium spp.* sobre *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Vibrio cholerae in vitro*. ASAHARA et al., (2001) mostraram aumento da resistência contra infecções provocadas por *Salmonella typhimurium* em ratos administrados com bifidobactérias. YILDIRIM & JOHNSON (1998) identificaram uma bacteriocina (bifidocina B) produzida por *B. bifidum* com efeito inibitório sobre o crescimento de algumas espécies do gênero *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Essa bacteriocina foi sensível a enzimas proteolíticas, ativa na faixa de pHs de 2 a 10, resistente ao calor e a solventes orgânicos sendo sua produção máxima durante a fase estacionária. COLLADO et al., (2005) constataram

inibição de *Helicobacter pylori* por compostos proteínicos, estáveis ao calor e sensíveis a proteases produzidos por *Bifidobacterium*. O mecanismo responsável pelo efeito antagonista conferido por bifidobactérias sobre *Helicobacter pylori* ainda não é bem definido (YILDIRIM & JOHSON, 1998).

O efeito antagonista efetivado pelas bactérias bífidas pode ocorrer devido ao ácido acético, bacteriocinas, moléculas semelhantes à bacteriocinas, e outras substâncias como peróxido de hidrogênio.

### 2.3.2.3. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Algumas bactérias do ácido láctico produzem peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio como resultado da ação de flavoproteínas oxidases ou peroxidases (NADH). Seu efeito antimicrobiano sobre vários patógenos é decorrente da oxidação de grupos sulfidrílicos, promovendo inativação de várias enzimas. Além disso, essa substância pode promover alteração na permeabilidade da membrana celular pela peroxidação dos lipídios nela presentes e danos ao DNA pela formação de radicais livres tais como (O<sup>2-</sup>) e hidroxil (OH<sup>·</sup>) (BYEZKOWSKI & GESSNER, 1988). As equações abaixo mostram a formação do peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila.



No processo de peroxidação da membrana o radical livre hidroxila capta um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado da membrana fosfolipídica e se transforma em água. O ácido graxo, em presença de oxigênio, gera um radical livre e dá início uma reação em cadeia que irá destruir a membrana celular. A membrana danificada, perde sua flexibilidade e suas funções de barreira permitindo influxo de cálcio na célula e ativando as fosfolipases. Estas enzimas continuam a lesar a célula, pois atacam a membrana lisosomal e liberam as enzimas lisosômicas, acelerando a degradação. Na molécula de DNA, o radical peróxido reage com os íons

ferro presentes na moléculas de DNA, produzindo o radical hidroxila. Este ataca principalmente a pirimidina na ligação com a desoxirribose, rompendo a ligação açúcar-fosfato e liberando as bases livres dos nucleotídeos (SILVA, 2003)

Lactobacilos desempenham importante papel na manutenção da saúde vaginal prevenindo o supercrescimento de patógenos tais como *Escherichia coli* e *Gardnerella vaginalis* pela produção de ácido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus jensenii* inibiram o crescimento de gonococci *in vitro* pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AMANT et al., 2002). AROUTCHEVA et al., (2001) examinando a atividade antimicrobiana de vinte e uma estirpes de *Lactobacillus sp.* de origem vaginal, observaram que aproximadamente 80% dessas estirpes produziram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido láctico e bacteriocinas e foram efetivas na inibição do crescimento de *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus gasseri in vitro* (MASTROMARINO et al., 2002).

O efeito antagonista de bactérias bífidas sobre patógenos pode também advir da modulação do sistema imunológico do hospedeiro.

#### **2.3.2.4. Imunomodulação**

Estudos têm indicado que bactérias probióticas, principalmente do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem agir promovendo efeitos positivos no sistema imunológico de humanos e animais (ISOLAURI, 2001; KALLIOMAKI et al., 2001; PERDIGON et al., 2001).

Imunomodulação observada como estímulo de Ig A na mucosa e aumento da atividade fagocítica em ratos ocorreu após consumo de *Lactobacillus johnsonii* LJ1 e *Lactobacillus salivarius* UCC 118. Essa imunomodulação não induziu resposta inflamatória que pudesse causar efeitos nocivos aos animais, e sim apresentou-se associada a alterações transientes benéficas, promovidas pelo consumo dos microrganismos (SCHIFFRIN et al., 1997).

Estudos *in vitro* com *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 inibiram a proliferação de linfócitos. Essas mesmas estirpes quando ministradas a crianças com eczema atópica severa, promoveram

melhorias significativas nos sintomas da doença quando comparada com o grupo placebo (MATTILA-SANDHOLM & SALMINEN, 1998).

Em ratos, a administração oral de *Lactobacillus casei Shirota* ou *Bifidobacterium breve* YJT-4064 ativaram a resposta humoral. Essas mesmas bactérias ministradas a crianças, promoveram aumento da produção de Ig A anti- rotavirus e redução significativa da frequência desse patógeno nas amostras de fezes (YASUI et al., 1999).

SAAVEDRA et al., (1994) mostraram que crianças alimentadas com fórmulas suplementadas com *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* apresentaram menor incidência de diarreia e menor taxa de rotavirus quando comparadas com crianças alimentadas somente com fórmulas. Resultados similares foram obtidos em experimentação com ratos tratados com *Bifidobacterium bifidus* (DUFFY et al., 1994).

Bactérias probióticas também podem promover estimulação do sistema imunológico local e sistêmico por sua adesão na superfície da mucosa intestinal, facilitando o contato com os tecidos linfáticos (SALMINEN et al., 1996). Além disso, podem inibir o crescimento de patógenos no intestino por exclusão competitiva. BERNET et al., (1994), constataram exclusão de patógenos por *Bifidobacterium* empregando células Caco-2. Essas bactérias são capazes de prevenir a adesão de patógenos por meio de obstáculos estéricos bloqueando receptores específicos e também por meio de co-agregação (VEBRAEDES et al., 1996).

Bactérias probióticas, em especial bactérias bífidas, podem atuar antagonizando patógenos de várias maneiras, seja pelo estímulo do sistema imunológico, ou pela produção de várias substâncias como as descritas nesta revisão.

### **2.3.3. Translocação bacteriana**

A translocação bacteriana pode ser definida como a passagem de microrganismos viáveis e não viáveis e de produtos microbianos, tais como endotoxinas, do intestino através da mucosa epitelial para o interior de nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos extra intestinais (BERG e GARLINGTON, 1979). Esse processo tem sido estudado por vários pesquisadores, uma vez que diversas doenças, têm sido atribuídas à

presença de microrganismos intestinais endógenos nos órgãos (fígado, rim, coração, baço) e tecidos normalmente estéreis. Em alguns indivíduos, principalmente em imunocomprometidos, microrganismos translocados poderiam provocar bacteremia, e em casos mais extremos levar a falência múltipla dos órgãos (BERG, 1992). Daí ser importante verificar a capacidade de translocação antes de se introduzir qualquer microrganismo probiótico nos alimentos. Para Berg (1980), translocação bacteriana pode ser detectada em situações de alteração do balanço ecológico do trato gastrointestinal. Essa alteração pode ser desencadeada em indivíduos sob antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia e em situações de estresse, dentre outros, favorecendo o supercrescimento de bactérias patogênicas endógenas e conseqüentemente sua translocação. Outro fator que pode promover um supercrescimento de bactérias no trato intestinal é a ingestão de níveis elevados de microrganismos ( $10^6$ - $10^7$  UFCg<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup>), como por exemplo em alimentos fermentados ou contaminados. Deficiências no sistema imunológico do hospedeiro e aumento da permeabilidade ou danos na barreira da mucosa intestinal também podem promover translocação de bactérias endógenas para sítios extra-intestinais (BERG, 1995). As situações de supercrescimento bacteriano, deficiências das defesas imunológicas do indivíduo e injúria da mucosa intestinal estão relacionadas à translocação bacteriana.

#### **2.3.3.1. Supercrescimento Bacteriano**

O supercrescimento bacteriano intestinal é um dos principais fatores que promovem e possibilitam a translocação bacteriana para os nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos. Estudos têm mostrado que esse fenômeno ocorre mais frequentemente em modelos animais administrados oralmente com antibióticos, ratos “germ-free” monoassociados com patógenos, animais com obstrução ou cirurgia intestinal, estresse, dentre outros (BERG, 1995).

Nos indivíduos ou animais submetidos à antibioticoterapia, o supercrescimento bacteriano pode ocorrer pelo desbalanceamento da microbiota intestinal, permitindo o crescimento de bactérias endógenas resistentes ao antibiótico e a colonização do trato gastrointestinal por



patógenos não endógenos resistentes (BERG, 1995). Berg (1981) constatou que a administração oral de penicilina, metronidazol, ou clindamicina em ratos, promoveu redução da população cecal de anaeróbios endógenos estritos e permitiu o supercrescimento de *Enterobacteriaceae* endógenas e translocação bacteriana do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos. Esse mesmo autor observou, que trinta dias após o término da terapia com antibióticos, a microbiota intestinal foi reestabelecida e a translocação bacteriana cessada. Assim pacientes ministrados com antimicrobianos, mesmo após o término do tratamento podem estar sujeitos à translocação bacteriana. WELLS et al., (1987) ministraram metronidazol a ratos por três dias e verificou aumento significativo na concentração de bactérias aeróbias e facultativas intestinais acompanhado de translocação bacteriana para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM).

Nem toda bactéria endógena transloca com a mesma eficiência do trato gastrointestinal para nódulos linfáticos mesentéricos e outros sítios extraintestinais (STEFFEN et al., 1988). Alguns autores sugerem que essa capacidade esteja relacionada com o grau de sensibilidade do microrganismos ao oxigênio. BERG (1995), em seus experimentos com ratos “germ-free” monoassociados, constatou que *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias Gram-negativas, *Enterobacteriaceae* anaeróbias facultativas, tais como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* translocaram com maior eficiência. Bactérias Gram positivas tolerantes ao oxigênio, tais como *Staphylococcus epidermidis* e *Lactobacillus brevis*, translocaram em um nível intermediário e *Bacteróides fragilis*, *Bacteróides vulgatus* e *Fusobacterium russii*, que são bactérias anaeróbias estritas, translocaram menos do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos. Esse mesmo autor verificou ainda que os anaeróbios mais resistentes ao oxigênio translocam mais eficientemente do que aqueles mais sensíveis. Outros autores atribuem essa maior facilidade de translocação a capacidade da estirpe de aderir e ligar-se ao muco intestinal, sendo este um importante passo na penetração e conseqüentemente na translocação bacteriana (LJUNGDAHL et al., 2000). Seja qual for o mecanismo, o que se observa é que, embora haja maior concentração de microrganismos anaeróbios no intestino, a maior parte de bactérias translocantes são aeróbias e que a

migração de bactérias anaeróbicas tem sido reportada somente em casos extremos tais como, exposição à radiação (BROOK et al., 1984) e injúria térmica (WELLS, 1990), onde há quebra da integridade entérica.

A genética do hospedeiro parece não ter efeito apreciável na regulação da translocação bacteriana. Nenhuma diferença foi encontrada na translocação de Enterobacteriaceae endógenas do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos em quatorze estirpes de ratos (MAEJIMA et al., 1984).

### **2.3.3.2. Deficiências das defesas imunológicas do hospedeiro**

O trato intestinal é um órgão metabolicamente ativo, contendo vários tipos de leucócitos envolvidos na resposta imune (WIEST & RATH, 2003). Os componentes do sistema imunológico, incluindo imunidade associada a mucosa (imunoglobulinas secretoras), mediada por células (macrófagos e células T) e humoral (imunoglobulinas secretoras) desempenham importante papel no processo de redução da translocação (BERG, 1995).

As imunoglobulinas A secretoras (Ig As) inibem a associação da bactéria com o epitélio intestinal, reduzindo a penetração bacteriana de vários patógenos, como por exemplo, *Vibrio cholerae* e *Salmonella enteritidis* (BERG, 1995).

Imunidade mediada por células (macrófagos e células T) promovem uma segunda linha de defesa do hospedeiro contra translocação bacteriana para órgãos extraintestinais. Os macrófagos residentes nos nódulos linfáticos mesentéricos são posicionados estrategicamente para reduzir a translocação bacteriana do trato gastrointestinal para outros órgãos. Estes juntamente com os leucócitos polimorfonucleares englobam partículas, incluindo bactérias na superfície da mucosa e transportam-nas para nódulos linfóides e outros sítios (WELLS et al., 1987). Imunoestimulação não específica de macrófagos por meio de injeção com *Propionibacterium acnes* diminuiu translocação para os nódulos linfáticos mesentéricos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas mirabilis* (FULLER, & FULLER 1985). As células T ajudam a manter a imunidade humoral por meio da produção de anticorpos dependentes de células T, quimocinas e citocinas que abastecem e ativam macrófagos e neutrófilos (WIEST & RATH, 2003). GAUTREAUX et

al., (1993) examinaram o papel das células T em ratos “in vivo” por meio da diminuição de células T (CD4+ e/ou CD8+) por meio de injeção peritoneal de anticorpos monoclonal de células anti T. A completa diminuição dessas células no epitélio intestinal promoveu translocação de *Escherichia coli* para os nódulos linfáticos mesentéricos. A injeção de agentes imunossupressores, como a ciclofosfamida em ratos, promoveu a translocação de bactérias endógenas para os nódulos linfáticos mesentéricos, baço, fígado e rins (BERG, 1983).

As Imunoglobulinas séricas agem sinergisticamente com as células T e ou macrófagos aumentando a efetividade da fagocitose pelos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, prevenindo o início da translocação de bactérias do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos, ou ainda reduzindo a disseminação da bactérias translocando do nódulo linfático mesentérico para outros sítios extra-intestinais (BERG, 1995). Injeção intravenosa de Ig G contra *Escherichia coli* em ratos reduziu a proliferação desse patógeno para os nódulos linfáticos mesentéricos, baço, fígado, rins e sangue mas não reduziu o número de *Escherichia coli* translocando do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos (GAUTREAUX et al., 1990).

### **2.3.3.3. Injúria da mucosa intestinal**

O intestino abriga uma variedade de bactérias que podem desencadear doenças no hospedeiro (WILMORE et al., 1988), e em casos extremos, como em pacientes imunocomprometidos, a infecção promovida por essas bactérias pode desencadear septicemia ou até mesmo a falência múltipla dos órgãos, levando o paciente à morte (DEITCH, 1992). O hospedeiro possui uma série de defesas locais contra invasão de microrganismos intestinais endógenos tais como, muco, acidez gástrica, enzimas pancreáticas, bile, barreiras celulares epiteliais com suas junções intracelulares, dentre outros. Mucinas secretadas por células caliciformes, criam uma proteção que dificulta a penetração bacteriana (ARANOW & FINK, 1996). Muco também age como lubrificante, reduzindo danos promovidos por ácidos e outras toxinas luminiais. Secreções das células da mucosa são ricas em anticorpos (Ig A) que se ligam e agregam a bactéria,

prevenindo aderência e colonização (SPAETH et al., 1994). Ausência de bile no intestino tem mostrado facilitar a translocação bacteriana (SLOCUM et al., 1992), e a exposição à bile durante o crescimento bacteriano diminui a internalização epitelial de bactérias entéricas (WELLS et al., 1995). Todos esses mecanismos ajudam a prevenir a ligação do microrganismo ao epitélio, o qual é um importante passo na penetração e conseqüentemente na translocação bacteriana. Outra proteção imprescindível das funções vitais do hospedeiro contra invasão de microrganismos é o epitélio intestinal, que age como uma barreira prevenindo a passagem de várias substâncias nocivas (BERG, 1995). MOREHOUSE et al., (1986) promoveram inoculação intragástrica de ácido ricinoleico (potente ingrediente farmacológico que severamente danifica a mucosa intestinal) em ratos, e observaram aumento da translocação de várias espécies de bactérias endógenas do trato gastrointestinal. Assim, qualquer alteração nessa barreira, tal como injúria térmica, choque hemorrágico, endotóxico podem favorecer o processo de translocação de microrganismos intestinais (BERG, 1995). Alterações no fígado, tal como cirrose também tem mostrado favorecer o processo de translocação de bactérias endógenas para sítios extra-intestinais. Pacientes cirróticos podem ter a permeabilidade da mucosa intestinal alterada e em casos extremos até mesmo rompida pelo aumento da pressão portal, favorecendo a translocação bacteriana (GUARNER et al., 1997). Outro fator que contribui também para aumento da permeabilidade da mucosa intestinal nesses pacientes é a alta produção de endotoxinas (GUARNER et al., 1993). Tratamentos mediados por microrganismos probióticos, têm mostrado resultados promissores na prevenção da translocação em ratos com algum tipo de injúria. SUZUKI et al., (1997) constataram inibição da translocação de *Escherichia coli* do trato gastrointestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos em ratos injetados com Zymosan (agente inflamatório), pela administração oral de *Bifidobacterium longum*. EIZAGUIRRE et al., (2002), em seus experimentos com ratos possuindo parte do intestino ressecionado, constataram redução significativa no número de bactérias endógenas translocando para o sangue portal e nódulos linfáticos mesentéricos nos ratos que receberam *Bifidobacterium lactis* quando comparado com o controle que não recebeu o probiótico. Mais da metade

dos ratos tratados com a bactéria bífida não apresentaram translocação. ADAWI et al., (2001), em seus experimentos constataram redução significativa do número de bactérias translocando para os nódulos linfáticos mesentéricos e sangue portal em ratos com fígado submetido a injúria (injeção intraperitoneal de D-galactosamina) tratados com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarium*, quando comparado com o grupo controle que possuía o fígado submetido a injúria e não recebeu a combinação do probiótico. Segundo os autores, uma possível explicação para o ocorrido seria a estimulação do sistema imunológico e produção de mucinas pelas bactérias probióticas.

A translocação bacteriana envolve interações complexas entre os mecanismos de defesa e a capacidade para transpor a barreira intestinal e sobreviver em outro ambiente, sendo necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na presença de translocação no hospedeiro saudável ou debilitado (BERG, 1992). Ainda, segundo o autor, a translocação bacteriana da microbiota nativa, que normalmente coloniza o trato gastrointestinal em níveis populacionais elevados, pode ocorrer em taxas reduzidas, e de forma espontânea, através de mucosa de animais saudáveis.

Esse trabalho objetivou avaliar alguns parâmetros de segurança e funcionalidade atualmente recomendados tais como, susceptibilidade antimicrobiana, antagonismo ao crescimento de patógenos, toxicidade oral crônica e translocação bacteriana para validação de estirpes probióticas. Para tal, o estudo foi dividido em três fases em que a primeira objetivou-se selecionar dentre as estirpes de *Bifidobacterium breve* já isoladas de crianças, as mais sensíveis aos principais antibiogramas utilizados em UTIs neo-natal. A segunda fase teve como objetivo verificar a atividade antagonista *in vitro* de *Bifidobacterium breve* ao crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*. Na terceira fase, procurou-se verificar o efeito da concentração de bactérias bífidas ( $10^9$  UFC/ mL) ministradas diariamente aos ratos por 21 dias na translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço e a toxicidade oral crônica desses isolados.

# **CAPÍTULO 1: PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Bifidobacterium breve* AOS PRINCIPAIS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EM UTI- NEO NATAL**

## **1. INTRODUÇÃO**

Bifidobacteria foi primeiramente isolada e descrita por Tissier (1899 – 1900), de fezes de crianças alimentadas com leite materno, e posteriormente reconhecida como um grupo dominante na microbiota intestinal de recém nascidos saudáveis. Essas bactérias são Gram-positivas, não formadoras de esporos, não apresentam motilidade e são catalase negativas. São bacilos pleomorfos em forma de Y ou V, espatulados ou em forma de clava (TANNOCK, 1999). Vários benefícios à saúde humana além da prevenção de desordens intestinais têm sido atribuídos às bactérias bífidas, como por exemplo, redução do colesterol sanguíneo (MODLER, 1994; LIN, 2000), aumento da resposta imune do hospedeiro (ISOLAURI, 2001), melhoria da utilização da lactose por indivíduos intolerantes (GRIFFIN et al., 2002), redução do risco de câncer de cólon (COMMANE et al., 2005) e melhoria no metabolismo de proteínas e vitaminas (ARUNACHALAM, 1999; YOUNG & HUFFMAN, 2003). Por essa razão, novas estirpes têm sido identificadas e introduzidas em alimentos e produtos farmacêuticos (KLEIN et al., 1998). Entretanto, nos últimos anos, alguns relatos têm mostrado o isolamento de bactérias usadas como probióticas de fontes de infecções, o que tem provocado maior atenção e exigência por parte de pesquisadores e médicos com relação aos parâmetros de segurança que devem ser analisados antes da aprovação da estirpe como probiótica. Casos de infecções provocados por lactobacilos e bifidobactéria são raros e estimados em 0,05% - 0,4% de casos de endocardites e bacteremia (GASSER, 1994). A determinação da susceptibilidade antimicrobiana de novos isolados é um dos parâmetros que devem ser verificados (SAARELA, 2000), visando prevenir a entrada de microrganismos que possam carrear e disseminar genes de resistência codificados por plasmídeos para patógenos na cadeia alimentar. No entanto, a questão de resistência deve ser estudada com muito critério, pois na

prática, a maioria das bactérias são resistentes a alguns desses compostos. Se esta é intrínseca (baseada na fisiologia e peculiaridades estruturais da estirpe, sua transferência para outros microrganismos sensíveis é muito pouco provável, não representando portanto, risco de disseminação do gene de resistência para patógenos no intestino (WRIGHT, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar a susceptibilidade de estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos aos principais antibióticos utilizados em UTI neo-natal e selecionar aquelas estirpes mais sensíveis como um critério de segurança para uso desses isolados como probiótico em bancos de leite humano.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Culturas Lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

### **3.1. Origem e Manutenção dos isolados de bactérias bífidas**

As bactérias bífidas utilizadas nesta experimentação foram isoladas de fezes de recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno e sem o uso de antibióticos (TESHIMA et al, 2005). Para confirmação da identidade, as culturas foram submetidas à coloração de Gram, ao teste da catalase e ao perfil de fermentação de carboidratos Kit API CH 50 (BioMerieux – France). A determinação da diversidade genética foi realizada por PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis (RIORDAN e FITZGERALD, 1997). A confirmação do gênero *Bifidobacterium* foi complementada pelo teste da presença da enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase (E.C4.1.2.22) (SCARDOVI, 1986). Os isolados foram mantidos sob congelamento a -80°C em leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não gordurosos (LDR 12%) adicionados de solução de glicerol (20%) no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Lácticas, BIOAGRO.

Utilizou-se também estirpes padrão ATCC (American Type Culture Collection) de bactérias bífidas (*B. bifidum*, *B. longum* e *B. breve*), que foram mantidas nas mesmas condições descritas acima.

### **3.2. Ativação dos Isolados**

Antes de cada análise de sensibilidade aos antibióticos, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco®) modificado (ágar 0,075%, carbonato de sódio 0,02% e cloreto de cálcio dihidratado 0,01% e 1% de solução 0,05% de L cisteína.HCl) esterilizado, e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A solução de cisteína 0,05% foi esterilizada separadamente utilizando membrana Millipore (0,45µm) e adicionada asépticamente (1%) ao MRS modificado esterilizado.

### **3.3. Perfil de Sensibilidade aos Antibióticos**

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

Os isolados previamente ativados foram distribuídos (0,1mL) em placas de petri contendo ágar MRS modificado empregando-se técnica de *spread plate*. Foi utilizada uma suspensão de 10<sup>8</sup> UFC/ mL como inóculo (LEHTO AND SALMINEN, 1997). Os discos contendo os antibióticos foram adicionados as placas em pontos equidistantes sob leve pressão com auxílio de uma pinça esteril. Após 1h sob temperatura ambiente as placas foram incubadas a 37°C/ 48h em câmara de anaerobiose (anaerobac work station, Bug Box, Leeds, UK), utilizando-se mistura anaeróbica (Hidrogênio 10%, Dióxido de Carbono 5%, Nitrogênio, 85%).

Ágar MRS modificado, foi utilizado devido à alta exigência nutricional do gênero *Bifidobacterium*. Os halos de inibição foram medidos nas três



repetições. Os resultados médios foram avaliados de acordo com a Tabela padrão (SENSIFAR<sup>®</sup>). A escolha dos antibióticos utilizados nesta experimentação teve como base a frequência de uso nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Neonatais da cidade de Viçosa-MG.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Perfil de Sensibilidade a Antibióticos**

As estirpes de bactérias bífidas isoladas de fezes de recém nascidos apresentaram perfil de sensibilidade aos antimicrobianos avaliados semelhante àqueles das estirpes de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve* padrão (ATCC), utilizadas neste trabalho.

A Tabela 1 indica a susceptibilidade das estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos a estes agentes antimicrobianos. A susceptibilidade (porcentagem) das estirpes a cada agente antimicrobiano avaliado está indicada na Tabela 2.

Tabela 1: Susceptibilidade das estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil.

Bactérias bífidas	Diâmetro dos halos de inibição (cm) <sup>1</sup>													
	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1082	3.07 <sup>1</sup> (S) <sup>2</sup>	0.95 (R)	0.83 (R)	1.03 (R)	1.03 (R)	0.93 (R)	1.93 (S)	2.03 (S)	2.60 (S)	2.13 (S)	1.3 (R)	2.17 (S)	3.13 (S)	1.33 (R)
UFVCC1083	3.37 (S)	1.10 (R)	0.95 (R)	0.9 (R)	1.03 (R)	1.09 (R)	1.90 (S)	1.97 (S)	3.0 (S)	2.53 (S)	1.63 (I)	2.23 (S)	3.13 (S)	1.33 (R)
UFVCC1084	3.00 (S)	0.83 (R)	0.8 (R)	0.73 (R)	1,05 (I)	0.93 (R)	1.57 (I)	2.10 (S)	2.57 (S)	2.17 (S)	1.3 (R)	1.8 (S)	2.87 (S)	1.2 (R)
UFVCC1085	3.00 (S)	1.10 (R)	0.95 (R)	1.0 (R)	1.03 (R)	1.10 (R)	1.93 (S)	2.0 (S)	2.5 (S)	2.97 (S)	1.23 (R)	2.0 (S)	2.73 (S)	1.2 (R)
UFVCC1086	3.07 (S)	0.90 (R)	0.80 (R)	0.97 (R)	1.0 (R)	0.90 (R)	1.97 (S)	1.93 (S)	2.37 (S)	2.0 (S)	1.27 (R)	2.0 (S)	2.43 (S)	1.73 (I)
UFVCC1087	3.20 (S)	0.93 (R)	1,05 (R)	1.0 (R)	0.87 (R)	0.93 (R)	1.97 (S)	2.07 (S)	2.47 (S)	1.97 (S)	1.33 (R)	1.97 (S)	2.4 (S)	1.47 (I)
UFVCC1088	3.17 (S)	0.87 (R)	0.95 (R)	1.0 (R)	1.03 (R)	0.87 (R)	1.97 (S)	2.03 (S)	2.40 (S)	2.03 (S)	1.47 (I)	2.1 (S)	2.73 (S)	1.27 (R)
UFVCC1089	3.0 (S)	0.93 (R)	0.90 (R)	1.7 (S)	0.90 (R)	0.93 (R)	1.93 (S)	2.07 (S)	2.63 (S)	1.93 (S)	1.27 (R)	1.93 (S)	2.63 (S)	1.23 (R)
UFVCC1090	3.07 (S)	0.87 (R)	0,90 (R)	0.95 (R)	0.87 (R)	0.9 (R)	1.97 (S)	2.03 (S)	2.57 (S)	2.0 (S)	1.20 (R)	2.16 (S)	2.9 (S)	1.4 (I)
UFVCC1091	3.13 (S)	0.90 (R)	1,25 (R)	1.45 (I)	0.90 (R)	0.87 (R)	2.0 (S)	2.03 (S)	2.73 (S)	2.0 (S)	1.4 (I)	1.83 (S)	2.7 (S)	1.53 (I)
UFVCC1092	3.17 (S)	1.05 (R)	0.0 (R)	1,0 (R)	1.27 (I)	0.83 (R)	1.90 (S)	1.93 (S)	2.30 (S)	1.67 (I)	1.27 (R)	1.6 (S)	2.57 (S)	1.2 (R)
UFVCC1093	3.03 (S)	0.80 (R)	0.93 (R)	0.8 (R)	0.95 (R)	0.85 (R)	1.83 (S)	2.20 (S)	2.30 (S)	1.6 (I)	1.37 (R)	1.73 (S)	2.63 (S)	1.27 (R)

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

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

Tabela 1a: Susceptibilidade das estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont).

Bactérias bífidas	Diâmetro dos halos de inibição (cm) <sup>1</sup>													
	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1094	3.20 <sup>1</sup> (S) <sup>2</sup>	1.20 (R)	1.10 (R)	1.0 (R)	1.10 (I)	0.85 (R)	1.90 (S)	2.07 (S)	2.5 (S)	1.97 (S)	1.47 (I)	1.67 (S)	2.93 (S)	1.2 (R)
UFVCC1095	3.00 (S)	1.05 (R)	0.83 (R)	0.87 (R)	1.0 (R)	0.83 (R)	2.07 (S)	1.77 (S)	2.6 (S)	1.87 (S)	1.30 (R)	1.73 (S)	2.8 (S)	1.27 (R)
UFVCC1096	2.97 (S)	0.93 (R)	0.87 (R)	0.87 (R)	1.0 (R)	0.87 (R)	1.57 (I)	1.97 (S)	2.43 (S)	1.70 (I)	1.27 (R)	1.63 (S)	2.6 (S)	1.55 (I)
UFVCC1097	2.70 (S)	1.15 (R)	0.0 (R)	0.9 (R)	0.95 (R)	0.83 (R)	1.67 (I)	2.13 (S)	2.40 (S)	1.70 (I)	1.23 (R)	1.43 (S)	2.93 (S)	1.10 (R)
UFVCC1098	2.63 (S)	1.03 (R)	0.80 (R)	0.9 (R)	1.05 (I)	0.87 (R)	1.67 (I)	1.97 (S)	2.37 (S)	1.80 (S)	1.23 (R)	1.63 (S)	2.6 (S)	1.2 (R)
UFVCC1099	2.90 (S)	1.23 (R)	0.8 (R)	1.3 (I)	0.80 (R)	0.90 (R)	2.07 (S)	1.93 (S)	2.40 (S)	1.63 (I)	1.37 (R)	1.57 (S)	2.47 (S)	1.13 (R)
UFVCC1100	2.87 (S)	1.00 (R)	1.0 (R)	1.15 (R)	1.25 (S)	0.97 (R)	1.37 (R)	1.70 (S)	2.43 (S)	1.57 (I)	1.5 (I)	1.47 (S)	2.87 (S)	1.0 (R)
UFVCC1101	2.97 (S)	0.90 (R)	0.0 (R)	0.9 (R)	1.13 (I)	0.95 (R)	1.70 (I)	1.97 (S)	2.40 (S)	1.97 (S)	1.7 (I)	1.63 (S)	2.4 (S)	0.9 (R)
UFVCC1102	2.73 (S)	1.07 (R)	1.05 (R)	1.15 (R)	1.10 (I)	0.83 (R)	1.73 (I)	2.10 (S)	2.47 (S)	1.90 (S)	1.33 (R)	1.77 (S)	2.67 (S)	1.4 (I)
UFVCC1103	2.80 (S)	0.85 (R)	0.80 (R)	0.85 (R)	0.85 (R)	0.9 (R)	1.90 (S)	1.97 (S)	2.57 (S)	1.67 (I)	1.2 (R)	2.0 (S)	2.57 (S)	1.33 (R)
UFVCC1104	3.00 (S)	0.97 (R)	0.9 (R)	1.03 (R)	1.0 (R)	0.87 (R)	1.77 (I)	1.97 (S)	2.73 (S)	1.93 (S)	1.43 (I)	1.57 (S)	2.73 (S)	1.17 (R)

<sup>2</sup>/Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

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

Tabela 1b: Susceptibilidade das estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont).

Bactérias bífidas	Diâmetro dos halos de inibição (cm) <sup>1</sup>													
	AMP	AMI	CIP	SUL	OXA	GEN	CFE	VAN	AMO	CFL	ERI	MER	PEN	CRO
UFVCC1105	2.73 <sup>1</sup> (S) <sup>2</sup>	0.87 (R)	1.5 (R)	0.9 (R)	0.9 (R)	0.90 (R)	1.80 (S)	1.87 (S)	2.27 (S)	1.53 (I)	1.37 (R)	1.63 (S)	2.6 (S)	1.47 (I)
UFVCC1106	2.80 (S)	0.90 (R)	0.0 (R)	0.85 (R)	0.87 (R)	0.87 (R)	1.40 (R)	2.02 (S)	2.47 (S)	1.5 (I)	1.2 (R)	1.67 (S)	2.47 (S)	1.5 (I)
UFVCC1107	2.93 (S)	0.87 (R)	0.9 (R)	1.05 (R)	0.97 (R)	0.93 (R)	1.83 (S)	2.07 (S)	2.27 (S)	2.03 (S)	1.23 (R)	1.57 (S)	2.4 (S)	1.2 (R)
UFVCC1108	2.67 (S)	1.25 (R)	1.15 (R)	1.1 (R)	0.80 (R)	0.90 (R)	1.43 (I)	1.9 (S)	2.33 (S)	1.9 (S)	1.4 (I)	1.8 (S)	2.2 (S)	1.83 (I)
UFVCC1109	2.83 (S)	0.77 (R)	0.9 (R)	0.9 (R)	0.97 (R)	0.93 (R)	1.80 (S)	1.87 (S)	2.57 (S)	1.8 (S)	1.5 (R)	1.57 (S)	2.53 (S)	1.37 (I)
UFVCC1110	2.90 (S)	0.75 (R)	0.0 (R)	1.05 (R)	0.9 (R)	0.83 (R)	1.67 (I)	1.93 (S)	2.37 (S)	1.63 (I)	1.33 (R)	1.70 (S)	2.67 (S)	1.07 (R)
UFVCC1111	2.80 (S)	0.97 (R)	1.0 (R)	0.95 (R)	1.03 (R)	0.87 (R)	1.63 (I)	1.97 (S)	2.43 (S)	1.93 (S)	1.2 (R)	1.87 (S)	2.53 (S)	1.23 (R)
UFVCC1112	2.90 (S)	0.90 (R)	0.8 (R)	0.93 (R)	0.93 (R)	0.85 (R)	1.67 (I)	1.73 (S)	2.43 (S)	1.83 (S)	1.5 (I)	1.57 (S)	2.37 (S)	1.4 (I)
<i>B. bifidum</i>	3.87 (S)	0.90 (R)	1.73 (I)	0.95 (R)	2.03 (S)	0.8 (R)	3.47 (S)	3.23 (S)	3.13 (S)	2.83 (S)	3.53 (S)	4.27 (S)	4.53 (S)	4.00 (S)
<i>B. longum</i>	3.37 (S)	0.85 (R)	1.57 (I)	0.0 (R)	1.55 (S)	1.65 (R)	3.07 (S)	2.73 (S)	1.83 (I)	1.30 (R)	1.53 (R)	1.87 (S)	4.25 (S)	3.9 (S)
<i>B. breve</i>	3.97 (S)	0.90 (R)	1.73 (I)	1.6 (R)	1.27 (S)	1.07 (R)	3.70 (S)	3.50 (S)	2.10 (S)	1.67 (I)	2.40 (S)	2.93 (S)	4.23 (S)	4.17 (S)

<sup>2</sup>/Escala de susceptibilidade: (S) Sensível, (I) Intermediário, (R) Resistente.

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

Tabela 2: Susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de fezes de recém nascidos.

<b>Grupo antimicrobiano</b>	<b>Agente antimicrobiano (concentração)</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Sensível</b>
β-lactâmicos-penicilinas	Penicilina (10 UI)	0	0	100
	Oxacilina (1μg)	77	19	4
	Ampicilina (10μg)	0	0	100
β-lactâmicos-inibidores de lactamase	Amoxicilina (20 μg)	0	0	100
β-lactâmicos-cefalosporina	Cefalexina (30μg)	6	36	58
	Ciprofloxacina (5μg)	100	0	0
	Ceftriaxona (30μg)	65	35	0
	Cefalotina (30μg)	0	32	68
β-lactâmicos Carbapenemicos	Meropenem (10μg)	0	3	97
Aminoglicosídeos	Amicacina (30 μg)	100	0	0
	Gentamicina (10μg)	100	0	0
Macrolídeos	Eritromicina 15μg)	71	29	0
Glicopeptídeos	Vancomicina (30μg)	0	0	100
	Sulfonamida (300μg)	90	7	3

Verifica-se na Tabela 2 que todos os isolados foram resistentes a ciprofloxacina (5μg) e aos aminoglicosídeos gentamicina (10μg) e amicacina (30μg). A resistência para este último grupo de antibióticos, poderia ser explicada pela inibição do transporte do antimicrobiano na célula bacteriana, uma vez que sua entrada nas células procariontes é O<sub>2</sub>-dependente, sugerindo a resistência natural das bactérias bífidas (anaeróbias estritas), a este antibiótico (SILVA, 1999; MURRAY et al., 2000 e BROOKS et al., 2000). Sabe-se também que os aminoglicosídeos são mais amplamente utilizados para inibição de bactérias entéricas Gram-negativas (TORTORA et al., 2000).

Todos os isolados foram sensíveis aos β-lactâmicos-penicilina G, ampicilina e amoxicilina e ao glicopeptídeo vancomicina. A resistência a β-lactâmicos pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a produção de β-lactamases (penicilinase ou cefalosporinase) que hidrolisam o agente

antimicrobiano. Esta pode também resultar da impermeabilidade da parede celular ou alteração das proteínas que se ligam à penicilina – “*Penicillin-binding-protein*” (QUINTILIANI et al., 1999). Os resultados dessa experimentação corroboram aqueles encontrados por LIM et al., (1993), MILLER & FINEGOLG, (1967), CHARTERIS et al., (1997), YASID, et al., (2000) e AL-LAWATI et al., (2000). Esses autores ao analisarem a susceptibilidade antimicrobiana de bifidobacteria verificaram maior resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) e maior sensibilidade dessas estirpes a  $\beta$ -lactâmicos (Penicilina G, amoxicilina e ampicilina). A maioria das estirpes de bifidobacteria isoladas de fezes de crianças e de produtos comerciais avaliadas por KHEAR et al., (2004) foram susceptíveis a  $\beta$ -lactâmicos e, destes, a penicilina G exerceu maior efeito inibitório. Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina, agente antimicrobiano amplamente utilizado para inibir bactérias Gram-positivas. A vancomicina age impedindo a síntese da parede celular por meio da inibição da transglicosilação e transpeptidação dos precursores do peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana (GOODMANN & GILMAN, 1991). Os resultados desta experimentação corroboram aqueles encontrados por MOUBARECK et al., (2005) que avaliaram a sensibilidade de bactérias bífidas à vancomicina pelo método de difusão em placas e as 50 estirpes avaliadas mostraram-se sensíveis. No entanto, diverge daqueles obtidos por KHEADR et al., (2004) que encontraram resistência de todas as estirpes avaliadas pelo método de diluição em placas. Provavelmente, essa diferença ocorreu em virtude das diferentes metodologias utilizadas. A resistência a vancomicina é um fato que gera preocupação, pois este é um dos poucos antibióticos atualmente eficazes no tratamento de infecções clínicas causadas por patógenos multiresistentes (NICAS et. al., 1989). A Figura 1 indica a susceptibilidade da estirpe UFVCC 1083 à vancomicina e a outros agentes antimicrobianos avaliados.

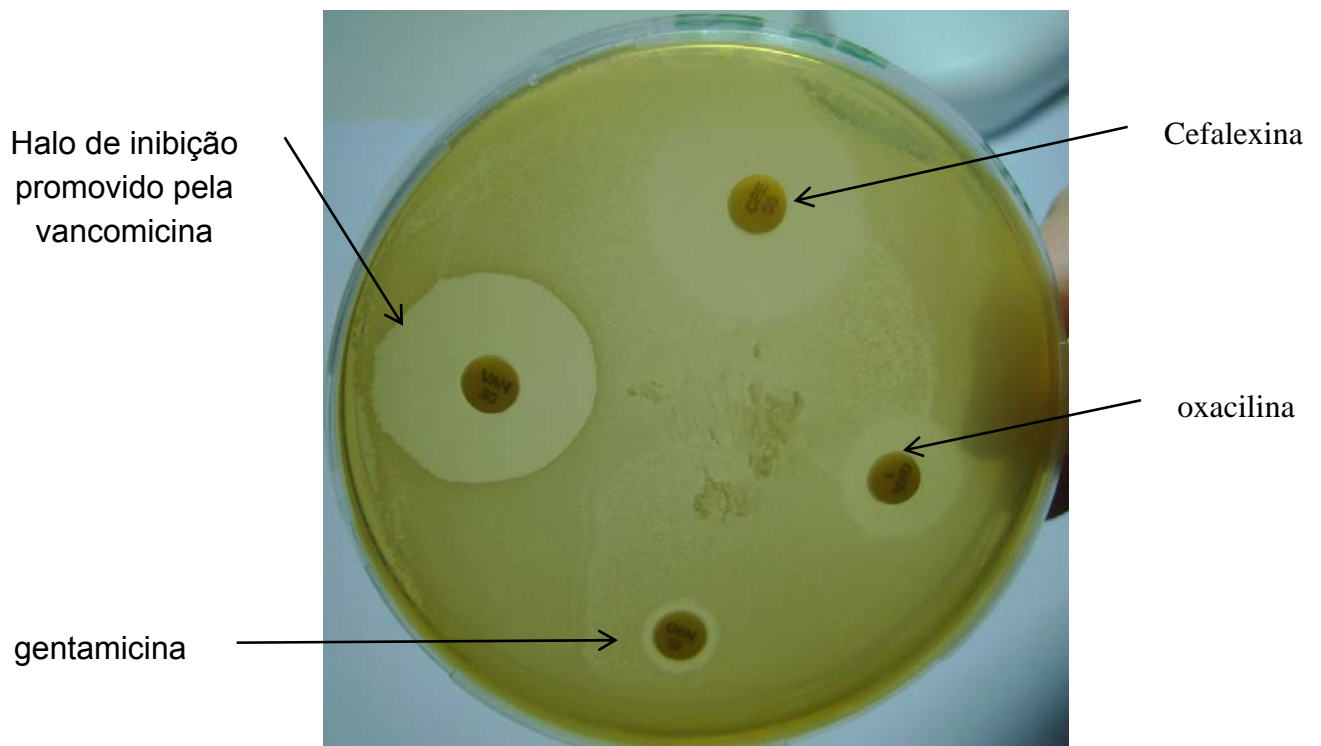


Figura 1: Susceptibilidade da estirpe UFVCC 1083 a alguns dos agentes antimicrobianos avaliados.

Todos os isolados exceto UFVCC1089, 1091 e 1099 foram resistentes a sulfonamidas (300 µg). Essa resistência é um fato comum na natureza e, é geralmente mediada por plasmídeos (TORTORA et al., 2000). Provavelmente, as estirpes sensíveis perderam o plasmídeo responsável por esta resistência.

Setenta e um por cento dos isolados foram resistentes a eritromicina e 29% foram intermediariamente sensíveis. Esses resultados diferem daqueles encontrados por CHARTERIS et al., (1998), YASID et al., (2000), ZHOU et al., (2005), MOUBARECK et al., (2005) que observaram sensibilidade de *Bifidobacterium sp.* a eritromicina. Provavelmente a diferença nos resultados obtidos ocorreu em virtude dos diferentes meios de cultura utilizados por esses autores (TPY e brucela acrescido de 5% de sangue de carneiro).

CHARTERIS et al., (1998) avaliaram a susceptibilidade de *Bifidobacterium sp.* à classe das cefalosporinas, e constatou maior sensibilidade das estirpes à cefalotina. Na presente experimentação, verificou-se o mesmo perfil de susceptibilidade (Tabela 2).

Sensibilidade elevada (97%), também foi observada para meropenem. Esse é um antibiótico de amplo espectro de ação e raramente são

encontradas estirpes a ele resistentes (BUYNAK, 2005). Para os outros antibióticos avaliados, a susceptibilidade foi variável.

A determinação da susceptibilidade antimicrobiana de novos isolados é um importante pré-requisito para sua aprovação como probiótico, pois visa prevenir a veiculação de estirpes carreadoras de genes de resistência e com isto, a possibilidade da transferência desses genes para outros grupos microbianos, incluindo patógenos, presentes no trato intestinal humano. A resistência a antibióticos deve ser avaliada com critério, uma vez que na prática, algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos antibióticos, quer seja pela presença do gene de resistência no cromossomo, pela própria fisiologia ou por peculiaridades estruturais da estirpe como, características da parede celular, perda da função ativa do antibiótico, não representando nestas situações, riscos de disseminação do gene para microrganismos sensíveis (WRIGHT, 2005). O conhecimento da susceptibilidade antimicrobiana das bactérias bífidas tem ainda uma aplicação prática no processo de manipulação de meios de cultura seletivos, favorecendo a contagem seletiva desses microrganismos probióticos carreados em alimentos funcionais. Além do conhecimento do perfil de sensibilidade a antimicrobianos, outros critérios, tais como resistência a sais biliares e ao suco gástrico, capacidade de translocação, antagonismo ao crescimento de patógenos, dentre outros, devem ser avaliados para seleção de estirpes probióticas.



## **5. CONCLUSÃO**

As 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém-nascidos apresentaram susceptibilidade variável aos 14 antibióticos avaliados, sugerindo que este fenótipo é estirpe dependente. No entanto, observou-se que a maioria das estirpes foram sensíveis aos antimicrobianos, o que é uma característica de segurança importante no processo de seleção desses isolados para uso como probiótico em bancos de leite humano, devido a possibilidade de transferência do genes de resistência no ambiente intestinal.

## CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS BÍFIDAS SOBRE PATÓGENOS

### 1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal humano é um habitat natural para uma variada e dinâmica comunidade bacteriana sendo colonizado por mais de 500 espécies (GUANER et al., 2003). Bactérias bífidas correspondem a uma porção significativa dessa microbiota benéfica, sendo a terceira maior população do intestino humano, precedidas somente pelos gêneros *Bacteroides* e *Eubacterium* (CHARTERIS, et al., 1997). Vários benefícios a saúde do hospedeiro têm sido atribuídos às bactérias bífidas, que além de estimularem a resposta imune promovem a modulação da microbiota intestinal endógena pela liberação de compostos inibitórios no meio (FOOKS et al., 1999). OZBAS & AYTAC (1995), FUJIWARA et al., (1997) e SERVIN (2004) mostraram *in vitro* inibição de bactérias bífidas sobre o crescimento de vários patógenos como por exemplo *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, rotavirus, *Shigella dysenteriae* e *Yersinia enterocolitica*.

Alguns mecanismos como por exemplo, diminuição do pH local pela produção de ácidos orgânicos, produção de bacteriocinas ou de substâncias de atuação semelhante à de bacteriocinas, competição por nutrientes e sítios de adesão, estimulação do sistema imune dentre outros, têm sido sugeridos para ação inibitória de bifidobactérias contra microrganismos patogênicos (SERVIN, 2004).

O efeito antagonista dos ácidos orgânicos (principalmente ácido acético e láctico) é promovido pelo abaixamento de pH do meio e ação bactericida da forma não dissociada do ácido (PODOLACK et al., 1996). Esta, por ser lipofílica pode difundir passivamente através da membrana, promovendo o colapso do gradiente protoeletroquímico ou ainda promover alteração na permeabilidade da membrana, comprometendo dessa forma o sistema de transporte de substratos (SNIJDER et al., 1985). As bacteriocinas também exercem seu efeito antagonista na maioria das vezes por promoverem colapso do potencial de membrana devido a formação de poros. Esses poros permitem a saída de íons, principalmente potássio e

magnésio, promovendo a dissipação da força protomotora, comprometendo a síntese de macromoléculas e produção de energia, e conseqüentemente resultando em morte celular (MONTIVILLE et al., 1995).

Por meio dos mecanismos acima descritos as bactérias bífidas promovem o equilíbrio da microbiota intestinal, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos. A atividade antipatógeno é um importante critério na seleção de bactérias potencialmente probióticas (SAARELLA et al., 2000).

## **2. OBJETIVOS**

Essa etapa do estudo objetivou verificar o efeito antagonístico “*in vitro*” dos isolados de *Bifidobacterium breve* sobre o crescimento de *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Culturas Lácticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

### **3.1. Origem e manutenção dos isolados de *Bifidobacterium breve***

As bactérias bífidas utilizadas nesta experimentação foram isoladas de fezes de recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno e sem o uso de antibióticos (TESHIMA et al, 2005). Para caracterização de identidade, as culturas foram submetidas à coloração de Gram, ao teste da catalase, ao perfil de fermentação de carboidratos Kit API CH 50 (BioMerieux – France), confirmando-se o gênero *Bifidobacterium* pelo teste da presença da enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase (SCARDOVI, 1986). Para determinação da diversidade genética empregou-se eletroforese de gel em campos alternados (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (RIORDAN e FITZGERALD, 1997). Os isolados foram mantidos sob congelamento a -80°C em leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não gordurosos

(LDR 12%) adicionados de solução de glicerol (20%) no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas, BIOAGRO.

### **3.2. Ativação dos isolados de *Bifidobacterium breve***

Antes de cada avaliação, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco®) modificado (ágar 0,075%, carbonato de sódio 0,02% e cloreto de cálcio dihidratado 0,01% e 1% de solução 0,05% de L cisteína.HCl) esterilizado e incubadas a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas. A solução de cisteína 0,05% foi esterilizada separadamente utilizando membrana Millipore (0,45µm) e adicionada assepticamente (1%) ao MRS modificado esterilizado.

### **3.3. Origem, manutenção e ativação dos microrganismos patogênicos indicadores**

Os microrganismos patogênicos indicadores utilizados nessa experimentação, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) foram cedidos pelo Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa. A estirpe de *Clostridium difficile* (ATCC 43596) foi obtida do banco de culturas pertencente ao Laboratório de Culturas Láticas da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados foram mantidos sob congelamento a -80<sup>0</sup>C em caldo BHI (Brain Heart Infusion Difco®) adicionados de solução de glicerol (20%). A estirpe de *Clostridium difficile* foi mantida sob as mesmas condições em caldo RCM (Reinforced Clostridium Medium Difco®).

Antes de cada avaliação as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas nos meios BHI ou RCM e incubadas a 37<sup>0</sup>C em aerobiose por 18 a 24 horas.

### **3.4. Avaliação do efeito antagonista**

Nesta experimentação foram utilizadas duas técnicas para verificação da atividade antagonista dos isolados de *Bifidobacterium breve* sobre o crescimento de microrganismos patogênicos: teste "spot" (FLEMING, 1975) e Difusão em placas (Well diffusion assay) (TAGG et al., 1976).

No método “spot” verifica-se o antagonismo de células viáveis dos microrganismos avaliados. No método de difusão em placas a inibição do microrganismo indicador é promovida pela presença de compostos inibitórios no sobrenadante livre de células de bactérias bífidas.

#### **3.4.1. Difusão em placas**

Foi adicionado 0,2 mL da cultura de cada isolado previamente ativo em 20 mL de caldo MRS modificado acrescido de (1%) de solução de cisteína 0,05%. Os tubos foram incubados a 37°C/ 24h. Após crescimento, a cultura de cada isolado foi distribuída em tubos de centrifuga Nalgene de polipropileno (50 mL) com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, em centrífuga Beckman GS-6R. Posteriormente o sobrenadante foi coletado e filtrado (membrana Millipore 0,45µm). Este foi mantido sob refrigeração até o momento de uso.

Orifícios de 7 mm foram feitos em ágar BHI (1,5%) inoculado com 10<sup>6</sup> UFC/ mL do patógeno indicador. Posteriormente, 30 µL do sobrenadante livre de células foram adicionados a cada um. As placas foram mantidas sob refrigeração “overnight” e posteriormente incubadas a 37°C/ 48h. Para análise do antagonismo contra *Clostridium difficile* empregou-se o mesmo procedimento acima descrito, porém o meio utilizado foi o ágar RCM e as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (GasPak, BBL) contendo geradores de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Anaerobac, Probac).

A atividade antagonista foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor dos orifícios.

#### **3.4.2. Teste “Spot”**

As bactérias bífidas previamente ativas (10<sup>9</sup> UFC/mL) foram “spotted” (fincadas) em 20 mL de ágar (1,5%) MRS modificado acrescido de 1% de solução de cisteína 0,05%. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C/48 horas em câmara de anaerobiose (anaerobac work station, Bug Box, Leeds, UK), utilizando-se mistura anaeróbica (Hidrogênio 10%, Dióxido de Carbono 5%, Nitrogênio, 85%). Após formação de colônias visíveis 10 mL de ágar (0,7%) BHI semi-sólido inoculado com 10<sup>6</sup> UFC/ mL da estirpe

indicadora foram vertidos sobre a placa. Estas foram mantidas sob refrigeração “overnight” e posteriormente incubadas a 37°C/ 48 horas em aerobiose. Para análise do antagonismo ao *Clostridium difficile* empregou-se o mesmo procedimento, porém o meio utilizado foi o ágar RCM semi sólido e as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (GasPak, BBL) contendo geradores de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Anaerobac, Probac).

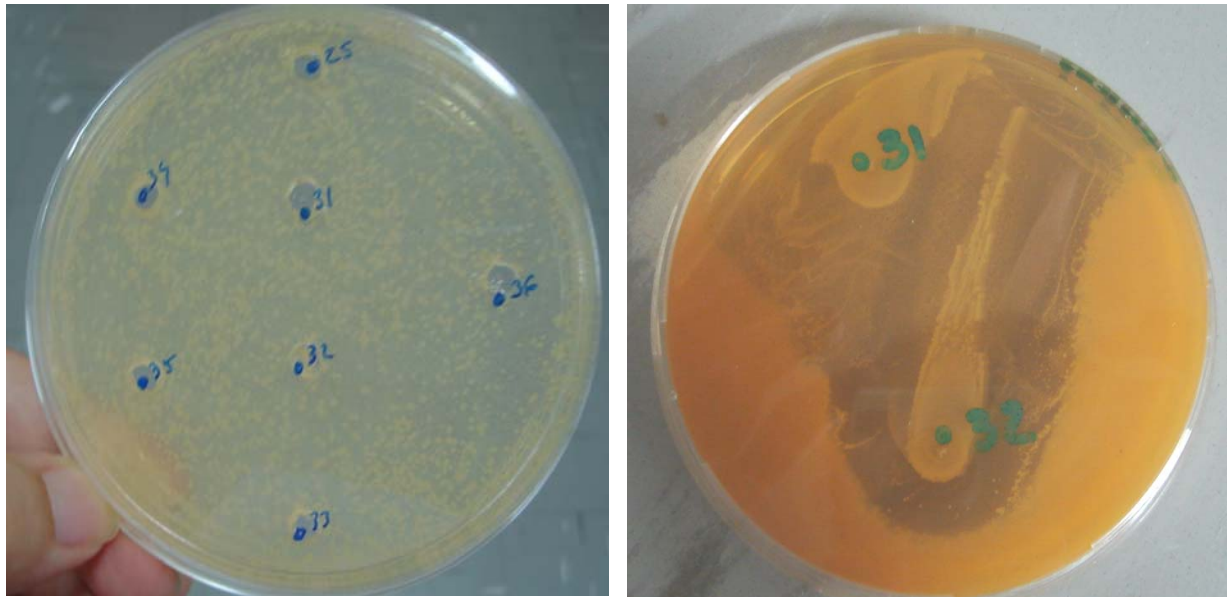
A atividade antagonista foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor das colônias.

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

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Antagonismo pelo método difusão em placas**

Nessa experimentação verificou-se que o sobrenadante livre de células dos 31 isolados de *Bifidobacterium breve* não promoveram atividade inibitória sobre o crescimento dos microrganismos patogênicos testados (Figura 1a), apesar dos baixos valores de pH atingidos (3,46 a 4,17). Entretanto, ao se realizar a técnica “spot” as estirpes testadas promoveram antagonismo variável ao crescimento dos patógenos avaliados (Figura 1b).



(a)

(b)

Figura 1: Atividade antagonista de bactérias bífidas isoladas de recém nascidos a *Salmonella typhimurium* pela técnica difusão em placas (a) e “spot” (b).

Legenda: 25 (UFVCC 1106); 31 (UFVCC 1107); 32 (UFVCC 1108); 33 (UFVCC 1109); 34 (UFVCC 1110); 35 (UFVCC 1111); 36 (UFVCC 1112).

Outros pesquisadores que utilizaram esta técnica encontraram resultados semelhantes. BEVILACQUA et al., (2003) observaram maior efeito inibitório sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* pela técnica “spot” que pelo teste de difusão em placas. Resultados similares foram encontrados por TOURÉ et al., (2003), quando avaliaram efeito antagonista de bactérias bífidas isoladas de fezes de crianças sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes*. MAKRAS & DE VUYST (2005) não observaram efeito inibitório do sobrenadante livre de células de 37 estirpes de bifidobacteria sobre o crescimento de *Escherichia coli* e *Listeria innocua* entretanto, inibição sobre o crescimento desses mesmos patógenos foi observada para 8 das 10 estirpes de bifidobacterias testadas pela técnica “spot”.

#### 4.2. Antagonismo pelo método “spot”

Os resultados obtidos para atividade antagonista dos isolados de bactérias bífidas sobre o crescimento dos patógenos pelo teste “spot” (células viáveis) em meio tamponado ou não está indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Número de estirpes de bactérias bífidas que apresentaram antagonismo aos patógenos testados.

Bactérias indicadoras	Número de estirpes de bactérias bífidas ativas pelo teste “spot”	Número de estirpes de bactérias bífidas ativas pelo teste “spot” em meio tamponado
<i>Clostridium difficile</i>	31 <sup>1</sup> /31 <sup>2</sup>	9 <sup>1</sup> /31 <sup>2</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	30/31	29/30
<i>Escherichia coli</i>	29/31	14/29
<i>Listeria monocytogenes</i>	25/31	24/25
<i>Staphylococcus aureus</i>	24/31	16/24

1- Número de estirpes de bactérias bífidas que apresentaram atividade antagonística ao crescimento dos patógenos avaliados.  
2- Número de estirpes de bactérias bífidas avaliadas.

As 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* apresentaram antagonismo aos patógenos avaliados, pela técnica “spot”, em diferentes proporções (Tabela 1).

Geralmente, bactérias bífidas atuam antagonizando patógenos devido a secreção de metabólitos biologicamente ativos, como por exemplo, ácidos orgânicos e bacteriocinas (VELRAEDS et al., 1996). Alguns autores têm atribuído esta atividade ao abaixamento do pH do meio, conferido pelo acúmulo de ácidos orgânicos (IBRAHIM & BEZKOROVAINY, 1993; BRUNO & SHAH, 2002). Nesta experimentação, observou-se que, mesmo em ágar MRS tamponado, algumas das estirpes de *Bifidobacterium breve* continuaram exercendo o efeito inibitório, sugerindo a existência de outros compostos antagonistas no meio além de ácidos orgânicos.

Esses resultados estão em conformidade com aqueles encontrados por MAKRAS & DE VUYST (2005), que constataram em seus experimentos a presença de outras substâncias antibacterianas além de ácido acético e lático na inibição de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* por bactérias bífidas. GAGNON et al., (2004) verificaram inibição de *Escherichia coli* O157:H7 por todas as estirpes de bactérias bífidas isoladas de recém nascidos pela técnica “spot”. Os autores concluíram que parte dessa inibição era promovida por ácidos orgânicos, mas outros fatores, não listados poderiam estar interferindo na inibição observada. TOURÉ et al., (2003)



constataram que 6 das 34 estirpes de bifidobacterias isoladas de fezes de crianças atuaram inibindo *Listeria monocytogenes*. Esses mesmos autores concluíram que o antagonismo exercido foi pH independente, uma vez que mesmo em meio tamponado com bicarbonato de sódio (2g/L) a atividade inibitória não foi reduzida. Além dos ácidos orgânicos, outros fatores têm sido listados como responsáveis pelo antagonismo a patógenos exercido por bactérias bífidas. Vários autores têm atribuído o efeito inibitório dessas bactérias à compostos lipossolúveis e/ou proteínáceos de baixo peso molecular. MEGHROUS et al., (1990) examinando o espectro inibitório de 13 estirpes de *Bifidobacterium spp.*, constataram que o antagonismo era promovido pela secreção de uma molécula de origem protéica, estável ao calor e ativa em pH 2-10, contra bactérias Gram positivas (*Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus*), mas não contra *Klebsiella spp*, *Serratia spp.* e *Escherichia coli*. Gibson e Wang (1994) constataram inibição de *Clostridium perfringes* e *Escherichia coli* pelo sobrenadante de bactérias bífidas neutralizado. LIÉVIN et al., (2000) atribuíram o antagonismo de bactérias bífidas sobre o crescimento de *Salmonella typhimurium* à produção de moléculas lipofílicas de baixo peso molecular (<3500Da). COLLADO & HERNANDEZ (2005a) atribuíram o efeito antagonista de 6 estirpes de *Bifidobacterium spp* à compostos com natureza de bacteriocinas. Estes foram ativos em pH 3-10, estável a 100°C/10 minutos, resistentes a amilase e lípases, porém sensíveis a tripsina, proteinase K, protease A e pepsina, com peso molecular variando de 10 – 30Kda.

Na presente experimentação verificou-se que as estirpes de *Bifidobacterium breve* utilizadas, exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* mesmo em meio tamponado, o que sugere a existência de outros fatores responsáveis pela inibição observada.

A diferença na detecção do poder inibitório das bactérias bífidas pelas duas técnicas utilizadas neste trabalho pode ser uma consequência da concentração da substância inibitória no sobrenadante pelo método da difusão em placas. A concentração na alíquota inoculada em cada orifício pode não ter sido suficiente para inferir o antagonismo passível de

observação na técnica “spot”. MAKRAS & DE VUYST (2005), somente constataram inibição sobre o crescimento de várias bactérias Gram negativas após promover a concentração do sobrenadante das bifidobacterias.

Outra possibilidade, seria a necessidade da presença de um fator de indução para produção da substância inibitória. Segundo TOURÉ et al., (2003), a incapacidade de detectar atividade inibitória pelo método de difusão do sobrenadante em ágar, não necessariamente implicou na ausência da atividade antibacteriana, mas sim na perda do contato célula-célula entre o indicador (patógeno) e a bactéria produtora. A presença de estirpes de bactérias bífidas com o patógeno no mesmo ambiente pode ter induzido a formação de substâncias inibitórias por essas estirpes.

## 5. CONCLUSÃO

Os 31 isolados de *Bifidobacterium breve* avaliados nesta experimentação apresentaram uma variabilidade na sua ação antagonista sobre os diferentes patógenos aqui testados pelo método “spot”. Verificou-se também que essa inibição foi estirpe dependente e não promovida somente por ácidos orgânicos, uma vez que não foi totalmente revertida quando utilizou-se meio tamponado. O efeito da substância inibitória somente foi detectado em meio sólido, sugerindo a necessidade de um fator de indução, como por exemplo, o contato com o microrganismo patogênico, para que esse seja expresso. Sugere ainda a necessidade de concentração da substância para que uma inibição pudesse ser observada (não testada nesse trabalho). Essa experimentação corrobora a necessidade de utilização de mais de uma técnica na avaliação do efeito antagonista de bactérias probióticas sobre patógenos, uma vez que os mecanismos envolvidos no antagonismo nem sempre é conhecido.

### **CAPÍTULO 3: ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL CRÔNICA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DE ESTIRPES DE *Bifidobacterium breve* POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Bactérias do ácido láctico (BAL), principalmente lactobacilos e bifidobacterias têm sido utilizadas por várias décadas, e são consideradas GRAS (geralmente reconhecidas como seguras). Os efeitos benéficos conferidos por essas estirpes para a saúde humana são bem documentados incluindo propriedades anti-infectivas (HARSHARNJIT & GILL, 2003), imunomodulação (KALLIOMAKI et al., 2001), efeito anti-tumor (SREEKUMAR & HOSONO, 2003) e hipocolesterolemia (LIN & CHEN, 2000), entre outros. Por isso, o desenvolvimento de alimentos funcionais contendo esses microrganismos vem sendo cada vez mais reconhecido como um nicho de oportunidades pela indústria alimentícia. Novas estirpes bacterianas com propriedades probióticas especiais estão sendo identificadas e introduzidas no mercado alimentício e farmacêutico (KLEIN et al., 1998). Entretanto, alguns relatos têm identificado bactérias do ácido láctico probióticas, como por exemplo, *Bifidobacterium breve* em meningite neonatal (HATA, et al., 1988; NAZAKAWA et al., 1996) e *Bifidobacterium longum* em situação de septicemia (YIM Há et al., 1999). Em nenhum dos casos no entanto, foi comprovada a relação da infecção com o consumo do probiótico. Esses relatos têm aumentado o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes que estão sendo introduzidas na cadeia alimentar humana. Aspectos de segurança, tais como origem das estirpes utilizadas, a ausência de histórico de patogenicidade para o gênero e de associação com doenças, ausência de genes de resistência a antibióticos, dentre outros, são importantes critérios para a seleção de uma estirpe probiótica antes de sua incorporação aos produtos alimentícios (SAARELA et al., 2000). Outro aspecto de segurança recomendado é a verificação da toxicidade da estirpe, avaliada de forma indireta, em experimentações com animais por meio do crescimento anormal de alguns órgãos e sua capacidade de translocar para

sítios extra-intestinais ou induzir translocação da microbiota intestinal endógena (ZHOU et al., 2000a).

A translocação bacteriana é definida como a passagem de microrganismos viáveis e não viáveis e de produtos microbianos, tais como endotoxinas, do intestino através da mucosa epitelial para o interior de nódulos linfáticos mesentéricos e para outros órgãos extra intestinais (BERG, 1979). Esse processo tem sido estudado por vários pesquisadores, uma vez que diversas doenças, tem sido atribuídas à presença de microrganismos intestinais endógenos nos órgãos (fígado, rim, coração, baço) e tecidos normalmente estéreis. Em alguns indivíduos, principalmente aqueles imunocomprometidos, microrganismos translocados poderiam provocar bacteremia, e em casos mais extremos levar à falência múltipla dos órgãos (BERG, 1992). Daí ser importante verificar a capacidade de translocação antes de se introduzir qualquer microrganismo probiótico nos alimentos. Para BERG (1980), translocação bacteriana pode ser detectada em situações de alteração do balanço ecológico do trato gastrointestinal. Essa alteração pode ser desencadeada em indivíduos sob antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia e em situações de estresse, dentre outros, favorecendo o supercrescimento de bactérias patogênicas endógenas e conseqüentemente sua translocação. Outro fator que pode promover supercrescimento de microrganismos nos intestinos é a ingestão de níveis elevados de microrganismos, como por exemplo em alimentos fermentados ou contaminados. Deficiências no sistema imune do hospedeiro e aumento da permeabilidade ou danos na barreira da mucosa intestinal também podem promover translocação de bactérias endógenas para sítios extra-intestinais (BERG, 1995).

Preconizam-se concentrações mínimas de  $10^6$  UFCg<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> de bactérias do ácido láctico e um uso prolongado (algumas semanas) para que estas possam exercer efeito probiótico (FERREIRA, 2003). Portanto, a avaliação da toxicidade crônica e da capacidade de translocação, podem ser considerados parâmetros imprescindíveis de avaliação em estirpes com potencial para uso como probiótico.

Nessa etapa do estudo verificou-se em ratos Wistar a translocação e a toxicidade oral crônica de um *pool* de estirpes de *Bifidobacterium breve*

isoladas de recém nascidos, com potencial de uso em bancos de leite humano.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Determinar em sistema murino a toxicidade oral crônica e a translocação de um *pool* de bactérias bífidas de uso potencial em bancos de leite humano.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Definir os isolados de bactérias bífidas endógenas para composição de um *pool*.
- Avaliar a compatibilidade dos isolados.
- Determinar a modulação da translocação nos órgãos.
- Determinar a toxicidade oral crônica do *pool* de bactérias bífidas.
- Caracterizar/Identificar microrganismos translocados para os órgãos

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética na Pesquisa com Seres humanos da Universidade Federal de Viçosa.

### **3.1. Origem e manutenção dos isolados**

As bactérias bífidas utilizadas nesta experimentação foram isoladas de fezes de recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno e sem o uso de antibióticos (TESHIMA et al, 2005). Para caracterização e identidade, as culturas foram submetidas à coloração de Gram, ao teste da catalase, ao perfil de fermentação de carboidratos Kit API CH 50 (BioMerieux – France), confirmando-se o gênero *Bifidobacterium* pelo teste da presença da enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase (SCARDOVI, 1986). Para determinação da diversidade genética empregou-se eletroforese de gel em campos alternados -Pulsed Field Gel Eletrophoresis (RIORDAN e

FITZGERALG, 1997), Os isolados foram mantidos no Banco de Culturas de interesse industrial/ Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC), Bioagro, Viçosa – MG sob congelamento a -80<sup>0</sup>C em leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não gordurosos (LDR 12%) adicionados de solução de glicerol (20%). Imediatamente antes do uso, os isolados foram ativados por meio de repicagens sucessivas em meios e condições adequadas.

### **3.2. Determinação do *pool* probiótico**

Para a determinação das bactérias que iriam compor o *pool* utilizou-se como parâmetro a resistência a sais biliares e a suco gástrico, a sensibilidade a antibióticos, antagonismo sobre patógenos e a compatibilidade entre as estirpes selecionadas, pelos critérios acima mencionados.

#### **3.2.1. Resistência a sais biliares e ao suco gástrico**

As 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* foram submetidas aos testes de resistência a sais biliares e suco gástrico (TESHIMA et al., 2005). De acordo com a autora, das 31 culturas de bactérias bífidas 14 (UFVCC1083, 1084, 1085, 1091, 1099, 1101, 1103, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1111 e 1112) apresentaram resistência a sais biliares e a suco gástrico, em níveis variados.

#### **3.2.2. Sensibilidade a antibióticos**

Para a determinação da susceptibilidade a antibióticos, empregou-se a técnica de difusão em placas (BAYER, 1966), utilizando-se discos impregnados com os antibióticos a serem avaliados, conforme protocolo descrito no item 3.3 (cap.1). A susceptibilidade a estes agentes antimicrobianos foi um parâmetro para a seleção das estirpes que compuseram o *pool* utilizado nesta experimentação.

Preferencialmente foram selecionados aqueles isolados que apresentaram maior sensibilidade frente aos antibióticos testados e maior resistência a sais biliares e ao suco gástrico. O emprego de mais de uma estirpe da espécie probiótica é uma prática que garante a complementação das características individuais de cada isolado.

### **3.3. Ativação dos isolados**

Antes das análises, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco®) modificado (ágar 0,075%, carbonato de sódio 0,02% e cloreto de cálcio dihidratado 0,01% e 1% de solução 0,05% de L cisteína.HCl) esterilizado e incubadas a 37<sup>0</sup>C/18h. A solução de cisteína 0,05% foi esterilizada separadamente utilizando membrana Millipore (0,45µm) e adicionada assepticamente (1%) ao MRS modificado esterilizado.

### **3.4. Compatibilidade dos isolados de bactérias bífidas**

A compatibilidade entre os isolados selecionados foi avaliada por meio de teste de antagonismo. Para tal foram utilizadas duas técnicas: teste “spot” (FLEMING, 1975) e Difusão em placas (Well diffusion assay) (TAGG et al., 1976).

No método “spot” verifica-se o antagonismo de células viáveis dos microrganismos avaliados. Já no de difusão em placas a inibição do microrganismo indicador é promovida pela presença de compostos inibitórios no sobrenadante livre de células de bactérias bífidas.

#### **3.4.1. Ensaio pelo método “Spot”**

Os isolados selecionados em 3.2.1 e 3.2.2 (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111) previamente ativos foram individualmente fincados (método “spot”) em 20 mL de agar (1,5%) MRS modificado acrescido de 1% de solução de cisteína 0,05%. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37<sup>0</sup>C/48 horas em câmara de anaerobiose (anaerobac work station, Bug Box, Leeds, UK), utilizando-se mistura anaeróbica (Hidrogênio 10%, Dióxido de Carbono 5%, Nitrogênio, 85%). Após formação de colônias visíveis, 10 mL de agar (0,7%) MRS modificado semi-sólido, inoculado com 10<sup>6</sup> UFC/ mL da estirpe indicadora (bifidobacteria) foram vertidos sobre a placa. Estas foram mantidas sob refrigeração “overnight” e posteriormente incubadas a 37<sup>0</sup>C/ 48 horas em câmara de anaerobiose. A atividade antagonística foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor das colônias (halos de inibição).



### **3.4.2. Ensaio Difusão em placas**

Cada isolado foi transferido separadamente (1%) para tubos contendo 20 mL de caldo MRS modificado acrescido de solução de cisteína 0,05%, seguindo-se incubação a 37°C/48 horas. Após crescimento, o conteúdo de cada isolado foi distribuído em tubos de centrifuga Nalgene, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação a 4000 rpm/20 minutos a 4°C, em centrifuga Beckman GS-6R. O sobrenadante coletado e esterilizado em membrana Millipore (0.45µm) foi recolhido em frasco previamente esterilizado e mantido sob refrigeração até o momento da adição aos orifícios no ágar.

Orifícios de 7 mm foram feitos em ágar (1,5%) MRS modificado inoculado com 10<sup>5</sup> UFC/ mL do microrganismo indicador (bactéria bífida). Foram feitos seis orifícios por placa. Posteriormente adicionou-se 30µL do filtrado em cada orifício. As placas foram mantidas sob refrigeração “overnight” e posteriormente incubadas a 37°C/ 48 horas em câmara de anaerobiose (anaerobac work station, Bug Box, Leeds, UK), utilizando-se mistura anaeróbica (Hidrogênio 10%, Dióxido de Carbono 5%, Nitrogênio, 85%). O efeito antagonista foi verificado por meio da formação de zonas claras ao redor dos orifício (halos de inibição).

A compatibilidade (ausência de halo) foi critério para a definição final dos isolados a serem colocados no *pool* de bactérias bífidas utilizado na presente experimentação.

### **3.5. Coleta do leite materno**

Para cada repetição foram preparadas sete bateladas do *pool* de bactérias bífidas, que após concentração adequada, foram ressuspensas (LPB) ou não (LP) em leite humano pasteurizado. Devido a pequena quantidade fornecida pelas doadoras, utilizou-se *pool* da matéria prima ordenhada, que foi obtida de oito doadoras voluntárias residentes no município de Viçosa-MG, saudáveis, com idade gestacional a termo e parto normal ou cesárea, com tempo de lactação compreendido entre 10-30 dias, não fazendo uso de medicamentos ou de antibióticos. Os padrões adotados para coleta e manutenção do leite humano foram conforme aqueles descritos no Manual de Rotina para Bancos de Leite Humano (Ministério da

Saúde, INAN, 1994). Após coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório e mantidas sob refrigeração. O *pool* do leite humano foi pasteurizado (65°C/30 minutos), e após resfriamento imediato (banho de gelo) foi dividido em duas partes, adicionadas (LPB) ou não (LP) do concentrado celular de bactérias bífidas ( $10^{10}$ UFC/mL). A Figura 1 indica a elaboração do *pool* de leite humano pasteurizado acrescido de bactérias bífidas (LPB) ou não (LP).

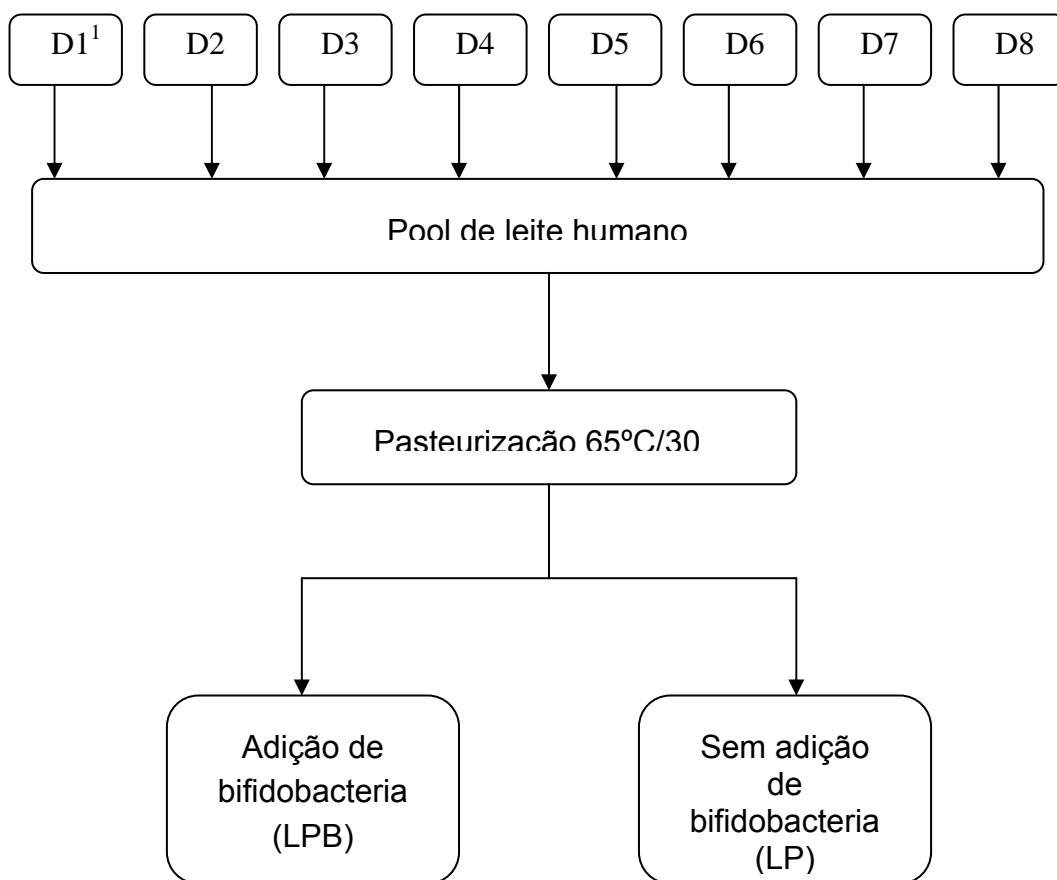


Figura 1: Elaboração do *pool* de leite humano pasteurizado acrescido de bactérias bífidas (LPB) ou não (LP).

D<sub>1</sub> = doadora 1

### 3.6. Preparo do concentrado bacteriano

As estirpes selecionadas (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111) foram ativadas separadamente, três vezes, em caldo MRS modificado, sendo a última

ativação feita em 420 mL do caldo em frasco erlenmeyer, seguida da incubação a 37°C/ 24 horas. Aos 420 mL de caldo foram adicionados 4,2 mL de cada cultura acima descrita. Após crescimento, o *pool* foi distribuído em tubos de centrifuga com tampas rosqueáveis Nalgene (50 mL) esterilizados. Seguiu-se centrifugação a 4000 rpm/10 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Beckman GS-6R. As células foram ressuspendidas em 100 mL de tampão fosfato esterilizado seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após descarte do sobrenadante o pellet foi ressuspendido em *pools* de leite materno, constituindo-se o *pool* probiótico, contendo cerca de 10<sup>10</sup> UFC/mL. Para certificar-se da homogeneidade dos “pools”, durante toda experimentação, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada concentrado para contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* em ágar MRS modificado. Foram feitos plaqueamentos em profundidade nas diluições apropriadas com incubação a 37°C por 48 horas em jarras de anaerobiose (Gás-Pak, BBL) contendo geradores de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Anaerobac-Probac do Brasil-SP).

O concentrado foi preparado a cada três dias, subdividido para uso diário e acondicionado em tubos de 5 mL previamente esterilizados e estocados a –20°C até o momento da administração aos animais.

### **3.7. Toxicidade oral crônica e translocação bacteriana**

Foram utilizadas 16 ratas da raça Wistar, adquiridas no Biotério da Universidade Federal de Viçosa, com 21 a 23 dias de vida, recém desmamadas e pesando entre 50 a 52 g. Após pesagem, os animais foram divididos em quatro grupos de quatro animais, de maneira que a média de peso inicial entre estes fosse homogênea. Os animais foram alocados em gaiolas individuais e a temperatura foi controlada para 25°C ± 5, mantendo-se ciclos de claro e escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos com 12g (primeira semana), 15g (segunda semana) e 18g (terceira semana) de ração Labina (Purina) diária e água “*ad libitum*” durante 21 dias e submetidos aos seguintes tratamentos:

*Grupo Basal*: Constituído de quatro animais, que foram sacrificados no dia de chegada (Tempo zero) para verificação da contagem inicial de microrganismos no fígado, rins, coração e baço.

*Grupo Controle:* Constituído de quatro animais / unidade experimental, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de água destilada (para manter o mesmo nível de estresse dos animais submetidos aos tratamentos) diariamente administrados via oral com auxílio de uma micropipeta esterilizada e água destilada “*ad libitum*”.

*Grupo Teste Leite Pasteurizado (LP):* Constituído de quatro animais/ unidade experimental, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de leite humano pasteurizado diariamente administrados via oral com auxílio de uma micropipeta esterilizada e água destilada “*ad libitum*”.

*Grupo Teste Leite Materno Pasteurizado + bacterias bífidas (LPB):* Constituído de quatro animais / unidade experimental, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de leite humano pasteurizado + bactérias bifidas diariamente administrados via oral com auxílio de uma micropipeta esterilizada e água destilada “*ad libitum*”.

Ao final do período de 21 dias de administração das dietas, os animais foram pesados e sacrificados (por asfixia com éter etílico). Antes de cada sacrifício, estes foram submetidos a um jejum de 12 horas. Após incisão abdominal foram removidos assepticamente os rins, coração, baço e fígado. Os órgãos foram lavados com solução salina (0,9%) estéril e acondicionados em sacos amostradores de polietileno (Whirl – Pak, Millipore). Após pesagem, os órgãos foram mantidos sob refrigeração até o momento do plaqueamento, o qual foi realizado no mesmo dia do sacrifício.

### **3.7.1. Avaliação da toxicidade por índice de peso do órgãos**

Após pesagem dos órgãos, os índices de peso do fígado, rins, coração e baço foram obtidos pela fórmula: peso do órgão (mg) x 100/ peso corpóreo do animal (g) (ZHOU et al., 2000).

### **3.7.2. Avaliação da translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço**

Após pesagem dos órgãos, os mesmos foram macerados dentro da própria embalagem, seguindo-se diluições decimais apropriadas. Os órgãos foram plaqueados (*pool*) em ágar MRS (em profundidade) modificado, acrescido de 1% de solução de cisteína 0,05% esterilizada a frio, para contagem de anaeróbios. As placas foram incubadas a 37°C/48 horas em

câmara de anaerobiose (anaerobac work station, Leeds, UK) utilizando-se mistura anaeróbica (Hidrogênio 10%, Dióxido de Carbono 5%, Nitrogênio, 85%).

Na análise dos resultados, foi utilizado o log da contagem UFC/g (unidades formadoras de colônias/ g) obtida para o *pool* de cada órgão.

### **3.7.3. Caracterização das bactérias translocadas**

Para identificação dos microrganismos translocados foram coletadas colônias (10) das placas dos diferentes órgãos e tratamentos utilizando-se como critério selecionar colônias diferentes (morfologia, coloração e tamanho) e que mais freqüentemente aparecessem nas placas. Estas foram estriadas em ágar MRS modificado acrescido de 1% de solução de cisteína 0,05% previamente esterilizada a frio. A incubação ocorreu a 37°C/48 horas em câmara de anaerobiose. Após crescimento as bactérias foram submetidas a coloração de Gram, ao teste da catalase e ao perfil de fermentação de carboidratos em Kit API CH 50 (BioMerieux – França).

#### **3.7.3.1. Perfil de fermentação de carboidratos das bactérias translocadas**

As culturas isoladas de cada colônia estriada foram ativadas três vezes consecutivas em caldo MRS modificado, sendo a última ativação feita em volumes de 20 mL, seguindo-se centrifugação a 4000 rpm/15 minutos a 4°C, em centrífuga Beckman GS-6R. Após descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o concentrado de células de cada cultura em 5 mL de tampão fosfato (pH=7,2) estéril, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 2 mL do mesmo tampão, e utilizado para caracterização em Kits API CH 50 (BioMerieux – France) conforme descrição do fabricante. Os resultados foram interpretados pelo programa do Kit API.

### 3.7.4. Análise Estatística

Para as características avaliadas índice dos órgãos e contagem total em ágar MRS modificado (UFC/g) no fígado, rins, coração e baço foi realizada análise de variância com base no delineamento em blocos casualizados com três repetições, a 5% de probabilidade. Posteriormente, foram estabelecidos três contrastes ortogonais, cujas estimativas foram testadas pelo teste t, dados por:

$$C_1 = 3m_{\text{basal}} - m_{\text{controle}} - m_{\text{LP}} - m_{\text{LPB}}$$

$$C_2 = 2m_{\text{controle}} - m_{\text{LP}} - m_{\text{LPB}}$$

$$C_3 = m_{\text{LP}} - m_{\text{LPB}}$$

Onde:

$m_{\text{basal}}$  = média do grupo basal

$m_{\text{controle}}$  = média do grupo controle

$m_{\text{LP}}$  = média do grupo tratado com leite humano pasteurizado (LP)

$m_{\text{LPB}}$  = média do grupo tratado com leite humano pasteurizado adicionado de concentrado celular (LPB)

Antes da realização dessas análises estatísticas, foram verificadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos erros experimentais pelo gráfico de probabilidade normal e pelo teste de Bartlett, respectivamente.

As análises estatísticas, foram feitas empregando-se o software MINITAB 14, licenciado no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Composição do *pool* probiótico

A Tabela 1 indica as diferentes características das estirpes de bactérias bífidas isoladas de crianças.

Tabela 1: Características de *Bifidobacterium breve* isoladas de crianças .

Bifidobacterium breve	Resistência a sais biliares	Resistência a suco gástrico	Compatibilidade entre os isolados	Sensibilidade à antibióticos	Ação antagonística sobre patógenos
UFVCC 1082	-	-	NA	7 <sup>1</sup> /14 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup> /5 <sup>4</sup>
UFVCC 1083	+	+	SIM	8/14	3/5
UFVCC 1084	+	+	NA	8/14	4/5
UFVCC 1085	+	+	NA	7/14	4/5
UFVCC 1086	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1087	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1088	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1089	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1090	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1091	+	+	SIM	10/14	5/5
UFVCC 1092	-	-	NA	8/14	4/5
UFVCC 1093	-	-	NA	7/14	5/5
UFVCC 1094	-	-	NA	9/14	5/5
UFVCC 1095	-	-	NA	7/14	4/5
UFVCC 1096	-	-	NA	8/14	4/5
UFVCC 1097	-	-	NA	7/14	5/5
UFVCC 1098	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1099	+	+	SIM	8/14	4/5
UFVCC 1100	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1101	+	+	NA	9/14	5/5
UFVCC 1102	-	-	NA	9/14	4/5
UFVCC 1103	+	+	SIM	7/14	4/5
UFVCC 1104	-	-	NA	8/14	5/5
UFVCC 1105	+	+	SIM	8/14	5/5
UFVCC 1106	+	+	NA	7/14	5/5
UFVCC 1107	+	+	NA	7/14	5/5
UFVCC 1108	+	+	SIM	9/14	4/5
UFVCC 1109	+	+	NA	8/14	5/5
UFVCC 1110	-	-	NA	7/14	5/5
UFVCC 1111	+	+	SIM	7/14	5/5
UFVCC 1112	+	+	NA	9/14	4/5

(-) resultado negativo para o teste analisado (ausência de resistência); (+) resultado positivo para o teste analisado (isolado resistente); NA teste não avaliado; 1 número de antibióticos que a estirpe foi sensível; 2 número de antibióticos avaliado; 3 número de patógenos que a estirpe exerceu antagonismo; 4 número de patógenos avaliados (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*). As áreas achuradas identificam as estirpes selecionadas para comporem o *pool* probiótico.

Com base nas avaliações de resistência ao suco gástrico e sais biliares (TESHIMA et al., 2005) e susceptibilidade a antibióticos (item 3.3 cap. 1) as estirpes selecionadas para composição do *pool* estão indicadas na Tabela 1.

A avaliação da resistência a sais biliares e ao suco gástrico é importante critério na seleção de bifidobactérias para utilização como probiótico, uma vez que essas estirpes necessitam atravessar obstáculos fisiológicos do trato gastrointestinal e atingirem o cólon (habitat natural) em números suficientes, para que possam promover benefício ao hospedeiro. Em combinação a esses parâmetros, estas devem apresentar sensibilidade frente a antibióticos, minimizando portanto, a possibilidade de disseminação do gene de resistência para patógenos no intestino.

#### **4.2. Compatibilidade dos isolados**

Após o período de incubação das placas não se observou a formação de halos de inibição tanto pela técnica do “spot” quanto pela difusão em placas, corroborando sua seleção para composição do “pool”.

#### **4.3. Número de células viáveis no *pool* de bactérias bífidas do concentrado**

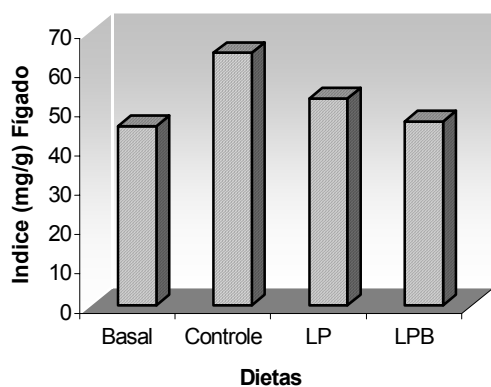
O concentrado celular de *Bifidobacterium breve* (UFVCC 1083, Ufvcc 1091, Ufvcc 1099, Ufvcc 1103, Ufvcc 1105, Ufvcc 1108 e Ufvcc 1111) apresentaram médias que variaram de  $1,33 \times 10^{10}$  a  $1,39 \times 10^{10}$ , o que conferiu concentrações apropriadas e homogêneas do probiótico durante a experimentação.

#### **4.4. Avaliação da toxicidade por índice de peso dos órgãos**

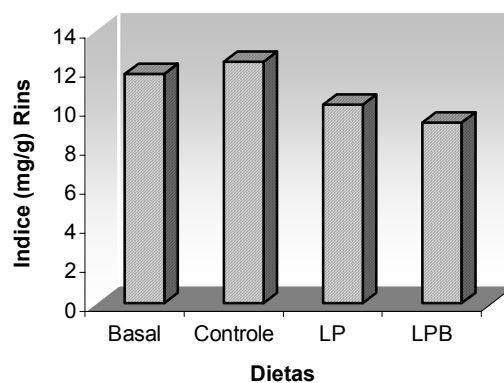
As pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos erros experimentais foram satisfeitas ( $P > 0,05$ ) para as características analisadas.

A Figura 2 indica, respectivamente, o valor médio dos índices do fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d), do grupo basal (T0), controle e dos animais que foram tratados com leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de bactérias bífidas. Na Tabela 2 são apresentadas as estimativas envolvendo os índices dos órgãos e peso dos animais avaliados.

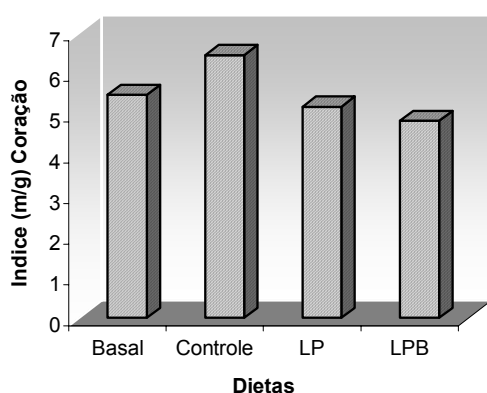




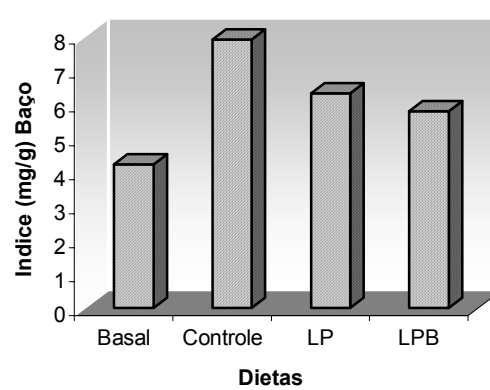
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2: Estimativas dos índices do fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico.

Tabela 2: Estimativa dos contrastes envolvendo os índices dos órgãos e peso dos animais avaliados.

Contrastes	Índice Fígado	Índice Rim	Índice Coração	Índice Baço	Peso do Rato
C <sub>1</sub>	-26,90	3,45	-0,04	-7,33	-163,78*
C <sub>2</sub>	29,10*	5,32*	2,88*	3,69	-27,94
C <sub>3</sub>	5,86	0,93	0,35	0,52	-2,94
CV (%)	11,74	12,13	14,50	28,00	10,60

\*Significativo pelo teste t (P<0,05).

C<sub>1</sub> (basal vs controle + LP + LPB), C<sub>2</sub> (controle vs LP + LPB) e C<sub>3</sub> (LP vs LPB)

CV (Coeficiente de variação)

O leite humano pasteurizado contendo bactérias bífidas utilizado nesta experimentação pode alterar os níveis da microbiota intestinal murina, em virtude da elevada ( $10^9$  UFC/ dia) dose diária administrada aos animais. Essas concentrações elevadas, poderiam promover translocação, geralmente envolvendo a microbiota endógena do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais (BERG, 1992). Uma das maneiras de se verificar algum tipo de toxicidade inferida aos órgãos é por meio da ocorrência de esplenomegalia ou hepatomegalia (ZHOU et al., 2000), que de forma indireta pode estar relacionada com o índice de peso dos órgãos.

Observa-se na Figura 2a que o índice do fígado do grupo controle foi ligeiramente maior se comparado aos índices do grupo basal (T0), LP (leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado acrescido de bactérias bífidas). Uma possível justificativa para o ocorrido, seria que algum fator estaria promovendo aumento do peso do fígado, e que provavelmente o leite pasteurizado acrescido ou não de bactérias bífidas estaria modulando o causador dessa alteração, fato que também pode ser verificado pelos índices desses tratamentos (LP e LPB) que após 21 dias de experimentação, praticamente não diferiram do basal.

As justificativas anteriores são confirmadas pelas estimativas dos contrastes  $C_1$  ( $P > 0,05$ ) e  $C_2$  ( $P < 0,05$ ) indicados na Tabela 2.

Isso indica que os grupos ministrados com leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) com bactérias bífidas não aumentaram ( $P > 0,05$ ) o índice do fígado após 21 dias de experimentação. Os índices desses grupos testes (LP e LPB) foram iguais ( $P > 0,05$ ) entre si e menores ( $P < 0,05$ ) do que o grupo controle.

Nas Figuras 2b e 2c, os índices dos rins e coração dos grupos testes (LP e LPB) foram menores que o índice do grupo basal (T0) e controle, o que mostra que o leite humano acrescido ou não de bactérias bífidas ministrado aos animais por 21 dias, não promoveram efeito de toxicidade sobre os órgãos. Tal fato sugere que as estimativas ( $P < 0,05$ ) do contraste  $C_2$  para ambos os órgãos, ocorreram em virtude dos tratamentos ministrados (LP e LPB). Do mesmo modo, não se observou diferença ( $P > 0,05$ ) entre esses tratamentos ( $C_3$ ).

Com relação ao baço (Figura 2d e Tabela 2), apesar da diferença visual entre o grupo basal e os demais, não ocorreram estimativas diferentes de zero ( $P>0,05$ ), o que pode ser devido a um maior valor do coeficiente de variação residual estimado no experimento.

Os resultados da presente experimentação corroboram aqueles encontrados por SHU et al., (1999) e ZHOU et al., (2000), que ministraram *Bifidobacterium lactis* a ratos por 7 e 30 dias respectivamente e não observaram diferença significativa no índice do baço entre o grupo controle e aquele que recebeu a bactéria probiótica. TESHIMA (2001), em seus experimentos administrou *Bifidobacterium breve* por 28 dias e não constatou diferença no índice do baço entre o grupo controle e teste (LP e LPB).

Os resultados obtidos na presente experimentação demonstraram que a ingestão por 21 dias das estirpes de *Bifidobacterium breve*, não promoveu toxicidade e nem efeito adverso na saúde dos animais, corroborando resultados obtidos pela equipe (RAMOS et al., 2006), que também não constataram citotoxicidade nos animais ministrados durante 30 dias com o mesmo *pool* de bactérias bífidas. Os autores concluíram ainda que o consumo do probiótico promoveu a viabilidade de 97% dos macrófagos.

A Figura 3 indica os pesos de ratos Wistar do grupo basal (T0), controle, e daqueles tratados com leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico por 21 dias.

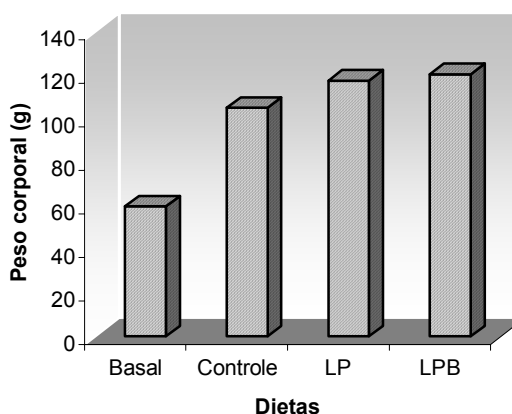


Figura 3: Pesos de ratos “Wistar” do grupo basal (T0), controle, e daqueles tratados com leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico por 21 dias.

Os resultados mostrados na Tabela 2 indicam que não houve diferença ( $P>0,05$ ) no peso dos animais do grupo controle e naqueles tratados com leite materno acrescido (LPB) ou não (LP) de bactérias bífidas ( $C_2$ ). Do mesmo modo, não houve diferença ( $P>0,05$ ) no peso dos animais desses tratamentos (LP e LPB) ( $C_3$ ). No entanto, após 21 dias de experimentação, o peso dos animais do grupo controle e daqueles que receberam o leite humano pasteurizado acrescido ou não de bactérias bífidas foram maiores ( $P<0,05$ ) do que os pesos observados no início da experimentação ( $C_1$ ).

#### **4.5. Translocação bacteriana para diferentes órgãos**

##### **4.5.1. Contagem de bactérias anaeróbias no fígado, rins, coração e baço**

A Figura 4 indica o valor médio das contagens log (UFC/ mL) de bactérias anaeróbias totais no fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) dos animais antes do início dos tratamentos (grupo basal) e após receberam a dieta (controle), dieta mais leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de bactérias bífidas por 21 dias. Na Tabela 3 são apresentadas as estimativas envolvendo o Log do número de células (UFC/g) nos órgãos dos animais avaliados.

Observa-se que as contagens de anaeróbios totais já se encontravam elevadas nos diferentes órgãos dos animais no início da experimentação (grupo basal). A mesma tendência foi observada para o grupo que não recebeu os tratamentos (grupo controle). No entanto, observou-se menor contagem de anaeróbios totais nos animais que receberam o leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de bactérias bífidas, indicando que esses tratamentos não foram responsáveis pela translocação bacteriana para esses órgãos.

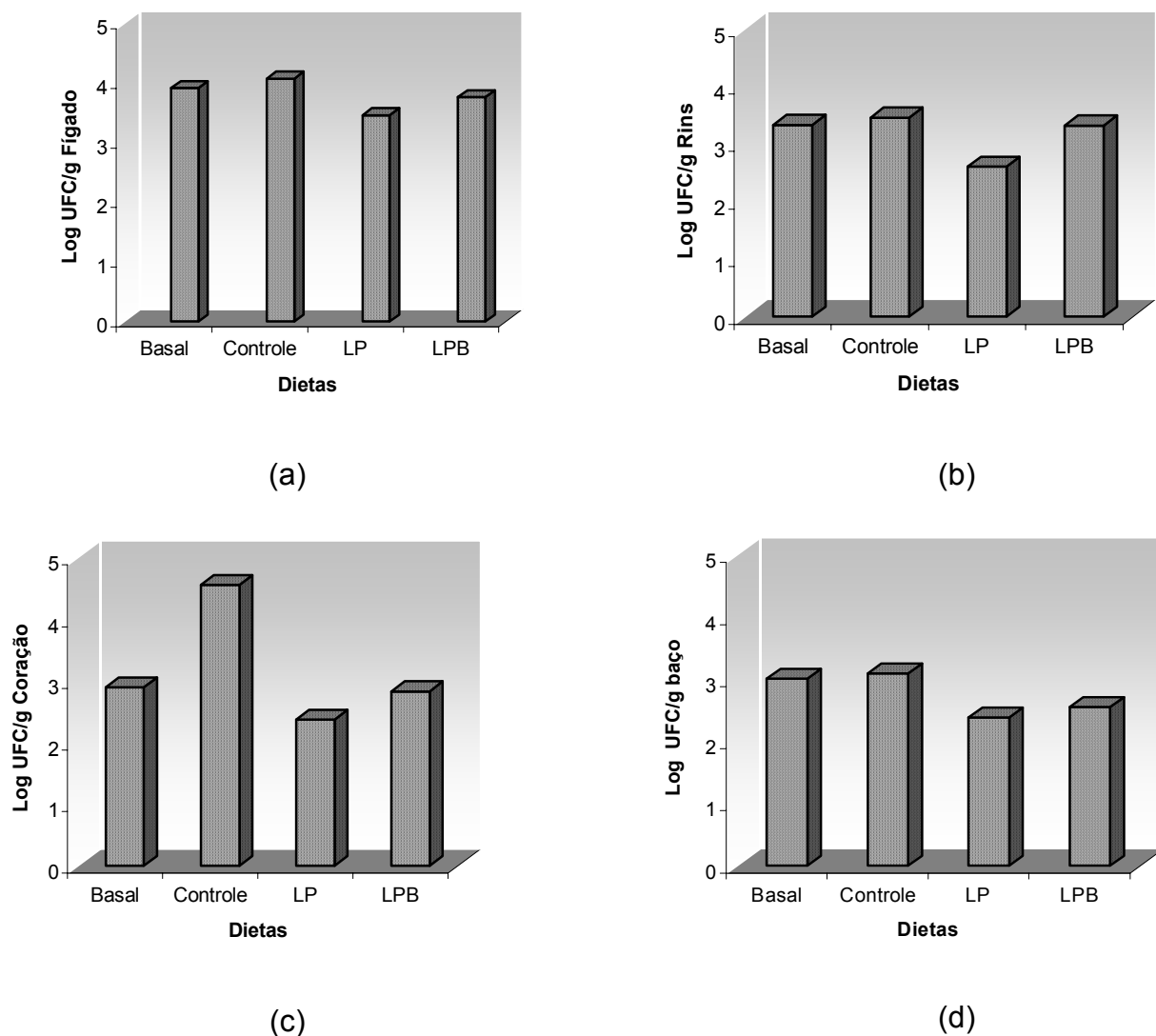


Figura 4: Estimativas das contagens Log (UFC/mL) de bactérias anaeróbias totais no fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico.

Tabela 3: Estimativa dos contrastes envolvendo o Log do número de células (UFC/g) nos órgãos dos animais avaliados.

Contrastes	Log Fígado	Log Rim	Log Coração	Log Baço
$C_1$	0,45	0,60	-1,06	1,0
$\hat{C}_2$	0,92	0,99	3,9	1,25
$\hat{C}_3$	-0,30	-0,71	-0,56	-0,17
CV (%)	13,23	12,52	46,07	42,13

$C_1$  (basal vs controle + LP + LPB),  $C_2$  (controle vs LP + LPB) e  $C_3$  (LP vs LPB)  
CV (Coeficiente de variação)

As estimativas dos contrastes (Tabela 3) foram nulas ( $P > 0,05$ ), e os valores se apresentaram bem próximos a zero, indicando não haver diferenças na passagem de bactérias anaeróbias do trato gastrointestinal para o fígado, rins, coração e baço nos animais do grupo controle e teste (LP e LPB). Este fato comprova que a administração de bactérias bífidas não induziu translocação de bactérias anaeróbias nesses órgãos, corroborando resultados indicados na Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização de bactérias\* anaeróbias totais translocadas para os diferentes órgãos analisados pelo perfil de fermentação de carboidratos (Kit API CH 50 - BioMerieux – France).

<b>Microrganismos</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Confiabilidade da identificação</b>
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	1	83,6%
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>	1	78,4%
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	99,8%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	83,4%
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	99,5%
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	77,7%
Não identificados pelo programa	2	-

(\*) bactérias Gram positivas e catalase negativas.

De acordo com o perfil de fermentação de carboidratos observou-se dentre as bactérias translocadas a predominância do gênero *Lactobacillus* nos órgãos analisados. *Lactobacillus*, *Lactococcus spp.* e *Leuconostoc spp.* são microrganismos anaeróbios facultativos, possuindo maior probabilidade de sobrevivência fora do sítio intestinal quando comparados com bactérias bífidas (anaeróbias estritas) (BERG, 1995). Alguns estudos têm mostrado a translocação de bactérias viáveis para diferentes órgãos em animais ministrados com lactobacilos. CONDÉ (2000) ministrou diariamente  $10^9$  UFC/ mL de *Lactobacillus acidophilus* a ratos “Wistar” por 14 dias e constatou maior translocação de microrganismos viáveis do trato gastrointestinal para o fígado, rins, coração e baço, nesta ordem, quando comparados com o grupo controle. A autora sugeriu ainda que os microrganismos translocados eram provenientes do tratamento ministrado aos animais, o que não foi observado na presente experimentação (Tabela 4). Ainda o mesmo grupo de pesquisadores ao ministrarem doses diárias

( $10^9$  UFC/ mL) de *Lactobacillus acidophilus* a ratos “*Rattus norvegicus* variedade *albinus*” por 14 dias constataram translocação de *Lactobacillus spp.* para o baço, fígado, coração e rins dos animais que receberam suplementação com a estirpe probiótica (SOUZA et al., 2004).

A baixa capacidade de bactérias bífidas translocarem tem sido relatada por alguns autores (BERG, 1983; STEFFEN et al., 1988; MA et al., 1990; SWANK AND DUTCH, 1996). ZHOU et al., (2000a) ministraram diariamente  $10^{11}$  UFC/ mL de *Bifidobacterium lactis* HNO19 durante 8 dias e após esse período não verificaram diferença significativa na translocação bacteriana para o fígado e baço dos ratos do grupo controle e daquele que recebeu o probiótico. Os autores constataram ainda que não havia bactérias bífidas dentre os microrganismos identificados nos órgãos pela técnica RAPD, e que as bactérias ali presentes eram mais provavelmente originadas da microbiota endógena. Em outro estudo, os mesmo autores (ZHOU et al., 2000b) ministraram a ratos três diferentes concentrações ( $5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^{10}$  e  $2,5 \times 10^{12}$  UFC/mL) de *Bifidobacterium lactis* HNO19 durante 28 dias, e não se constatou diferença significativa na translocação bacteriana para o fígado, rins e baço dos animais dos grupos controle e testes. *Bifidobacterium lactis* HNO19 ministrada ( $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^9$  e  $5 \times 10^{10}$  UFC/ mL) a ratos por um período de 7 dias não resultou em diferença significativa na translocação bacteriana para os rins e baço dos animais do grupo controle e daquele que recebeu o probiótico (SHU et al., 1999).

A maioria dos trabalhos realizados para avaliação da translocação de bactérias lácticas ocorrem em sistemas com animais desafiados com patógenos ou com algum tipo de injúria, como em ratos cirróticos (GUARNER et al., 1997), com síndrome do intestino curto (EIZAGUIRRE et al., 2002), injúrias no fígado ADAWI et al., 2001; SEEHOFER et al., 2004), antibioticoterapia (SUZUK et al., 1997), dentre outros. Nesses estudos, os autores têm constatado redução significativa da translocação bacteriana para sítios extra intestinais quando administrados com probióticos. Entretanto, poucos são os trabalhos que relatam translocação bacteriana em animais sadios ministrados com bactérias probióticas. Além disso, na maioria das publicações não há indicação dos valores das contagens

encontradas nos órgãos dificultando a comparação com os resultados obtidos na presente experimentação.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as estirpes de *Bifidobacterium breve* testadas não translocaram para o fígado, rins, coração e baço, após 21 dias de tratamento. A translocação bacteriana é um indicador recomendado para ensaios de segurança com estirpes potencialmente probióticas, uma vez que este é o primeiro passo do processo de patogenicidade para estirpes oportunistas endógenas (BERG, 1983).



## 5. CONCLUSÃO

As estirpes de *Bifidobacterium breve* (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111) de origem humana, utilizadas na presente experimentação, não promoveram efeitos adversos na saúde geral dos animais testados, uma vez que não induziram toxicidade oral crônica (não promovendo crescimento anormal do fígado, rins, coração e baço dos animais estudados) e nem promoveram translocação de bactérias do trato gastrointestinal para outros órgãos após 21 dias de tratamento. No entanto, recomenda-se a realização da mesma experimentação com outros mamíferos, incluindo humanos saudáveis, antes da implantação dessas estirpes nos bancos de leite humano. Recomenda-se também, verificar a toxicidade oral aguda, ministrando concentrações mais elevadas do *pool* probiótico por um menor tempo.

## CONCLUSÃO GERAL

As 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém-nascidos apresentaram susceptibilidade variável aos 14 antibióticos avaliados, sugerindo que este fenótipo é estirpe dependente. No entanto, observou-se que a maioria das estirpes foram sensíveis aos antimicrobianos, o que é uma característica de segurança importante no processo de seleção desses isolados para uso como probiótico em bancos de leite humano, devido a possibilidade de transferência do genes de resistência no ambiente intestinal.

Os isolados de *Bifidobacterium breve* avaliados nesta experimentação apresentaram uma variabilidade na sua ação antagonista sobre *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* pelo método “spot”. Verificou-se também que essa inibição foi estirpe dependente e não promovida somente por ácidos orgânicos, uma vez que não foi totalmente revertida quando utilizou-se meio tamponado. O efeito da substância inibitória somente foi detectado em meio sólido (método “spot”), sugerindo a necessidade de um fator de indução, como por exemplo, o contato com o microrganismo patogênico, para que esse seja expresso. Essa experimentação corrobora a necessidade de utilização de mais de uma técnica na avaliação do efeito antagonista de bactérias probióticas sobre patógenos, uma vez que os mecanismos envolvidos no antagonismo são diferentes.

As estirpes de *Bifidobacterium breve* de origem humana selecionadas para composição do *pool* probiótico (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111), utilizadas na presente experimentação, não promoveram efeitos adversos na saúde geral dos animais testados, uma vez que não induziram toxicidade oral crônica (não promovendo crescimento anormal do fígado, rins, coração e baço dos animais estudados) e nem promoveram translocação de bactérias do trato gastrointestinal para outros órgãos após 21 dias de tratamento. No entanto, recomenda-se a realização da mesma experimentação com outros mamíferos, incluindo humanos saudáveis, antes da implantação dessas estirpes nos bancos de leite humano. Recomenda-se também, verificar a toxicidade

oral aguda, ministrando concentrações mais elevadas do *pool* probiótico por um menor tempo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., ROMBOUTS, F. M., HUGENHOLTZ, J., GUIHARD, G. & LETELLIER, L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 1962-1968. 1994.
- ADAWI, D., AHRNÉ, S., GÖRAN, M. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in na acute liver injury model. **International Journal of Food Microbiology** 70, 213-220, 2001.
- ALAKOMI, H. L., SKYTТА, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Appl. Environ. Microbiol**, 66, 2001-2005, 2000.
- AL-LAWATI, A., CROUCH, N.D. AND ELHAG, K. M, Antibiotic consumption and development of resistance among gram-negative bacilli in intensive care units in Oman. **Annals of Saudi Medicine**, 20(2-3):324-327. 2000.
- AMANT, D.C., VALENTIN-BON, I.E. AND JERSE, A.E. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. **Infect. Immun.** 70, 7169–7171, 2002.
- ARAKI, T., SHINOZAKI, T., IRIE, Y., & MIYAZAWA, Y., Trial of oral administration os *Bifidobacterium breve* for the prevention of rotavirus infection. *Jornal of Japanese Association of Infectious Diseases* 1999., 73: 305-310. In: HARSHARNJIT, S.G., Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Nutrition Research*. VOL 17, N°5, p. 755-773, 2003.
- ARANOW, J. S., FINK, M. P. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. **British Journal of Anaesthesia**, 77: 71-81, 1996.
- ARNOLD, L. D.W., LARSON, E. Immunologic beneffts of breast milk in relation to human milk banking. **American Journal Infect Control** 21, 235-242, 1993.

- AROUTCHEVA, A., GARITI, D., SIMON, M., SHOTT, S., FARO, J., SIMOES, J.A., GURGUIS, A. AND FARO, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 185, 375–379, 2001.
- ARUNACHALAM, K. D., Role of Bifidobacteria in nutrition, Medicine and Technology. **Nutrition Research** Vol 19. N° 10 pp.1559-1597, 1999.
- ASAHARA, T., NOMOTO, K., WATANUKI, M. AND YOKOKURA, T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45, 1751–1760, 2001.
- AUSTIN, D. J., KRISTINSSON, K. G., ANDERSON, R. M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **PNAS** 96, 1152–1156, 1999.
- BARBOSA, H.M, TORRES B.B, FURLANETO M.C. **Microbiologia Básica.** Ed. Atheneu, São Paulo, 1998.
- BAWER, A.W., KIRLY. W. M. M, SHERRIS, J. C., TURK, M., Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology** 45, 493-493, 1966.
- BAYER, A. S., CHOW, A. W., BETTS, D. AND GUZE, L. B. Lactobacillemia report of nine cases, important clinical and therapeutic considerations. **American Journal of Medicine** 64, 808- 813, 1978.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The hole of probiotic flora. **Gut**, v.42, 2-7, 1998.
- BERG, R. D. Bacterial Translocation From Gastrointestinal Tract. **Trends in Microbiology** vol.3 n° 4, 149-154, 1995.
- BERG, R. D. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tract of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. **Infect. Immun.** 33, 851-861, 1981.
- BERG, R. D. The intestinal microflora in health and disease, **Academic Press** 333-352, 1983.
- BERG, R. D. Translocation and the indigenous gut flora. **Scientif basis of probiotic concept**, 55-85, 1992.
- BERG, R. D., BERNASCONI, P., FOWLER, D., GAUTREAUX, M. Inhibition of *Cândida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice

- by oral administration of *Saccharomices boulardii*. **Journal Infect. Dis.** 168, 1314-1318, 1993.
- BERG, R. D., GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity** 23, 403-411, 1979.
- BERG, R. Inhibition of *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract by normal cecal flora in gnotobiotic or antibiotic decontaminated mice. **Infect. Immun** 29, 1073-1081, 1980.
- BERNET, M.F., BRASSART, D., NEESER, J.R. AND SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut** 35, 483–489, 1994.
- BERNET-CAMARD, M.-F., LIEVIN, V., BRASSART, D., NEESER, J.-R., SERVIN, A.L., HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 2747–2753, 1997.
- BEVILACQUA, L., OVIDI, M., DI MATTIA, E., TROVATELLI, L. D., CANGANELLA, F. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. **Microbiological Research**, 158, 179-185, 2003.
- BEZIRTZOGLU, E. The intestinal Microflora During the first weeks of life. **Anaerobe** 3, 173-177, 1997.
- BORBA, L. M., CASTRO, L. C.V., FANCESCHINE, S. C. C., FERREIRA, C. L. L. F. Composição do leite humano e microbiota predominantemente bífida de lactente em aleitamento materno exclusivo. **Nutrire**, v. 25, nº1, 135-154, 2003.
- BORRIELLO, S. P., HAMMES, W. P., HOLZAPFEL, W., MARTEAU, P., SCHRENMEIR, J., VAARA, M., VALTONEN, V. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. **Clinical Infectious Diseases** 36, 775-780, 2003.
- BROOK, I., MACVITTIE, T.J., and WALKER, R. I., Recovery of aerobic and anaerobic bacteria from irradiated mice. **Infection and Immunity**; 46: 270–271, 1984

- BROOKS, G. F., BUTEL, J. S. & MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**, 21 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 117-141, 2000.
- BRUNO, F.A., SHAH, N.P. Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. **Milchwissenschaft**, 57, 617–621, 2002.
- BUYNAK, J. D., Understanding the longevity of the  $\beta$ -lactam antibiotics and antibiotic/  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, **Biochemical Pharmacology**, 8890: 11-22, 2005.
- BYEZKOWSKI, J., GESSNER, T., Biological role of superoxide ion-radical. **International Journal of Biochemistry**, 20, 569-580, 1988.
- CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., & COLLINS, J. K, Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. **International Journal of Food Microbiology** 35, 1-27. 1997.
- CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 26, 333-337, 1998.
- CHRISTIAN, S.S, CHRISTIAN, J. F., The cephalosporin antibiotic. **Elsevier Science**, 1068-607, 168-174, 1997.
- CHULADA, P.C., ARABES S.J. Jr, DUNSON, D., ZELDIN, D.C., Breast-Feeding and the prevalence of asthma and wheeze in children: analyses from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Allergy clin Immunol**, v. 111, p.328-336, 2003.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 71, 1-20, 2001.
- COCONNIER, M.H., LIEVIN, V., BERNET-CAMARD, M.F., HUDAULT, S. AND SERVIN, A.L. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41, 1046–1052, 1997.
- COLLADO, M. C., HERNANDEZ, M., SANZ, Y. Production of Bacteriocin-Like Inhibitory Compounds by Human Fecal *Bifidobacterium* Strains. **Journal of Food Protection** vol 68, nº5 pp 1034-1040, 2005a.

- COLLADO, M.C., GONZÁLEZ, A., GONZÁLEZ, R., HERNÁNDEZ, M., FERRÚS, M.A., SAZ, Y., Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 25, p. 385-391, 2005b.
- COLLINS, M.D. e GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am J. Clin. Nutr.**, v69 (suppl), p. 1052S-1057S, 1999.
- COMMANE, D., HUGHES, R., SHORTT, C., ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research** 591, 276-289, 2005.
- CONDE, M. R. G. Translocação e desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* em baço, fígado, rins e coração de ratos. Universidade Federal de Viçosa, 2001 56p. (Tese MS)
- COUSOUDIS, A., PILLARY, K., SPOONER, E., KUHN, L., COOVADIA, H.M Influence of infant-feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1, 2003. In: American Academic Of Pediatrics. Breastfeeding and the use of human milk, **Pediatrics**, v. 115, nº2, 2005.
- CROCIANI, F., ALESSANDRINI, A, MUCCI, M. M . BIAVATI, B., Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium spp.* **International Journal of Food Microbiology** 24, 199-210, 1994.
- DANIELSEN, M; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus ssp.* to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology** 82, 1-11, 2003.
- DEITCH, E. A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. **Ann. Surg.** 216, 117-134, 1992.
- DUFFY, L. C., ZIELEZNY, M. A., RIEPENHOFF-TALTY, M., DRYJA, D., SAYAHTAHERI-ALTAIE, S., GRIFFITHS, E., RUFFIN, D., BARRETT, H., ROSSMAN, J., OGRA, P.L. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. **Pediatr. Res.**, 35: 690-695, 1994.
- DUGGAN, C., GANNON, J., WALKER, W. A., Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **American Journal of clinical nutrition**, 75, p. 789-808, 2002.



- EIZAGUIRRE, I., URKIA, N. G., ASENSIO, A. B., ZUBILAGA, P., VIDALES, C., ARENZANA, J. M. G., ALDAZABAL, P., Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. **Journal of Pediatric Surgery** vol 37, nº 5, p.699-702, 2002.
- FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção** Ed. Suprema Gráfica e Editora, 1ª ed, Viçosa-MG, 2003.
- FLEMING, H. P., ETCHELLS, J.L., COSTILOW, R.N., Microbial inhibition by na isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology** ;30(6):1040-2, 1975.
- FOOKS, L. J ., GIBSON, G. R., Probiotics as modulators of the gut flora. **Br. J. Nutr.** 88, 39-49, 2002.
- FOOKS, L. J., FULLER, R., GIBSON, G. R Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, 9, 53-61, 1999.
- FOOKS, L. J., GIBSON, G. R., Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*, **Anaerobe**, 9: 231-242, 2003.
- FORESTIER, C., DE CHAMPS, C., VATOUX, C. AND JOLY, B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Res. Microbiol.** 152, 167–173, 2001.
- FUJIWARA, S., HASHIBA, H., HIROTA, T., FORSTNER, J. F., Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. **Applied end Envirommental Microbiology**, 63, 506-512, 1997.
- FULLER, K. G., BERG, R. D., Microflora Control and its Applications to the Biomedical Sciences (Wostmann, B. S., ed), pp. 195-198, Alan R. Liss 1985. In: BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology** 149, v. 3. nº 4, 1995.
- FULLER, R. **History and development of probiotics.** In: **R Fuller (Ed) Probiotics.** The Science basis. New York. Chapman and hall, p. 111-144, 1992.

- GAGNON, M., KHEADR, E. E., LE BLAY, G., FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food microbiology**, 92, 69-78, 2004.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, 84, 577-592, 2002.
- GASSER, F. Safety of lactic-acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. **Bulletin de L'Istitut Pasteur**, 92: 45-67. 1994.
- GAUTREAUX, M. D., DEITCH, E. A, BERG, R. D **Microecol. Ther** 20, 31-34, 1990.
- GAUTREAUX, M. D., DEITCH, E. A., BERG, R. D., **Infect Immun** 62, 2874-2884, 1993.
- GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **Journal of Nutrition** 125, 1401-1412 1995.
- GIBSON, G. R., WANG, X. Regulatory effects of Bifidobacteria on the growth other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology** 7, 412-420, 1994.
- GIUGLIANI, E. R. J. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: Tecnologia para Exportar. **Jornal de Pediatria** v. 78, nº3, 2002.
- GOLDING J, Unnatural constituents of breast milk: medication, lifestyle, pollutants, viruses. **Early Human Development**, v. 49: S29-S43, 1997. (Suppl.).
- GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus* biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology** 10, 139-157, 1999.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E. TREVIÑO, M. G., JIMÉNEZ-SALAS, Z. Bacteriocinas de probióticos. **Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición**, Vol 4 No.2 , 2003.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232p.
- GRIFFIN, I. J., DAVILA, P. M., ABRAMS, S. A., Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes, **British Journal of Nutrition**, 87, 187-191, 2002.

- GUARNER, C., RUNYON, B. A., YOUNG, S., HECK, M., SHEIKH, M. Y. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. **Journal of Hepatology**, 26, 1372-1378, 1997.
- GUARNER, C., SORIANO, G., TOMAS, A., BULBENA, O., NOVELLA, M., BALANZO, J., VILARDELL, F., MOURELLE, M., MONCADA, S. Increased serum nitrite and nitrate in patients with cirrhosis of the liver: relationship to endotoxemia. **Hepatology**, 18, 1139-1143, 1993.
- GUARNER, F., MALAGELADA, J. R., Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519, 2003.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 348p, 1988.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**, 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1013, 1997.
- HARSHARNJIT, S. GILL. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** Vol 17, Nº 5, pp 755-773, 2003
- HATA, D., YOSHIDA, A, OHKUBO, H., Meningitis caused by *Bifidobacterium* in infant. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 7, 669-671, 1988.
- HEINIG, M. J., Host defense benefits of breastfeeding for the infant effect of breastfeeding duration and exclusivity. **Pediatr. Clin. North. Am.** 48, 105-123, 2001.
- HILTON, E., RINDOS, P., & ISENBERG, H.D *Lactobacillus GG* vaginal suppositories and vaginitis. **Jornal of Clinical Microbiology**, 33, 1433. 1995.
- HOYOS, A. B. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. **International Journal of Infectious Diseases**, 3, 197-202. 1999.
- HUIS IN'TVELD, J.H.J., SHORTT, C. Selection criteria for probiotic microorganisms. In: LEEDS, A.R., ROWLAND, I.R. Ed . **Gut Flora and Healthc – past, present and future**. Internaciona Congress and Symposium 219, Royal Society of Medicine Press Limited p.27-36.1996.
- IBRAHIM, S., BEZKOROVAINY, A., Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. **Journal of Food Protection**, 56, 713-715, 1993.

- ISHIBASHI, N., YAMAZAKI, S. Probiotics and Safety. **Journal Clin Nutr** 73 (suppl):465S-70S, 2001.
- ISOLAURI, E. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.** 73, 444-450, 2001.
- ISOLAURI, E., ARVOLA, T., SUTAS, Y, MOILANEN, E., & SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clinical and experimental allergy**, 30, 1604-1610. 2000.
- JUNIOR, M. A. S, FERREIRA, E. S, CONCEIÇÃO, G. C., Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, edição 63, 2004.
- KABIR, A. M., AIBA, Y., TAKAGI, A, KAMIYA, S., MIWA, T., KOGA, Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**, 41, 49-55, 1997.
- KALLIOMAKI, M., SALMINEN, S., ARVILOMMI, H., KERO, P., KOSKINEN, P., ISOLAURI, E., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, 357. 1076-1079, 2001
- KASHKET, E. R., Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Reviews**, 46, 233-244, 1987.
- KHEADR, E., BERNOUSSI, N., LACROIX, C., FLISS, I. Comparison of the sensibility of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins. **International Dairy Journal** 14, 1041-1053, 2004.
- KIM, K, PICKERING, K, DUPONT, H.L, SULLIVAN, N, WILKINS, T. In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. **J Infect Diseases**, v. 150, 57-62, 1984.
- KLAENHAMMER, T. R., Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemie** 70, 337-349, 1988.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C. AND REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 41, 103-125, 1998.

- KOPP-HOOLIHAN, L, Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. **Journal of American Dietetic Association**, 101, 229-238 quiz 239-241, 2001.
- KOROIKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 783p.
- KUNZ C, RODRIGUEZ-PALMERO M, KOLETZKO B, JENSEN R. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. **Clin Perinatol**, v. 26, 307-333, 1999.
- LAWRENCE, R.A, LAWRENCE, R.M. Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession. **St Louis**, 1999.
- LAZDUNSKI, C.J. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. **Biochimie** 70, 1291–1296, 1988.
- LEHTO, E.M. AND SALMINEN, S.J. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus strain* GG spent culture supernate: only a pH effect? **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.** 18, 125–132, 1997.
- LIÉVIN, V., PEIFFER, I., HUDAULT, S., ROCHT, F., BRASSART, D., NEESER, J. R., SERVIN, A.L. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut**, 47, 646-652, 2000.
- LIM, K. S., HUH, C. S. AND BAEK, Y. J, Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **J. Dairy Sci.** 76, 2168-2174. 1993.
- LIN, S. Y., CHEN, C. T., Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. **Journal Food Drug Anal.**, 8, 97-102, 2000.
- LJUNGDAHL, M., LUNDHOLM, M., KATOULI, M., et al. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**; 35: 389–397, 2000.
- LUCAS, A, COLE, T. J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. **Lancet**, 336: 1519-1523, 1990.
- MA, L., DEITCH, E., SPECIAN, R., STEFFEN, E., BERG, R., Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. **Curr. Microbiol**, 20, 17-184, 1990.

- MACKIE, R. I., SGHIR, A., GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, 1035S-1045S, 1999.
- MAEJIMA, K., DEICH, E. A and BERG, R. D. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. **Arch. Surg**, 119, 166-172, 1984.
- MAKRAS, L., DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, 2005.
- MAN, J.C. DE; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E., A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, p.130-135, 1960.
- MASTROMARINO, P., BRIGIDI, P., MACCHIA, S., MAGGI, L., PIROVANO, F., TRINCHIERI, V., CONTE, U. AND MATTEUZZI, D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. **J. Appl. Microbiol.** 93, 884–893, 2002.
- MATTILA-SANDHOLM, T., SALMINEN, S. Up-to-date on probiotics in Europe. **Gastroenterol. Int.** 11, 8–16. 1998
- MAY, J.T., Human milk- tables of the antimicrobial factors and microbiological contaminants relevant to human milk banking, 1998.
- MEGHROUS, J., EULOGE, P., JUNELLES, A. M., BALLONGUE, J., PETITDEMANGE, H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. **Biotechnol. Lett.** 12, 575-580, 1990.
- MICHETTI, P., DORTA, G., WIESEL, P.H., BRASSART, D., VERDU, E., HERRANZ, M., FELLE, C., PORTA, N., ROUVET, M., BLUM, A.L., CORTHESEY-THEULAZ, I. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. **Digestion** 60, 203–209, 1999.
- MIDOLO, P. D., LAMBERT, J. R., HULL, R., LUO F., GRAYSON, M. L. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. **J. App. Bacteriol.**, 79: 475-479, 1995.
- MILLER, L. G., FINEGOLD, S. M., Antibacterial sensibility of *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*). **Journal of Bacteriology**, 93, 125-130, 1967.
- MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology** 6, 263-268, 1990.

- MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. Asia Pacific. **J. Clin. Nutr.** V.1, p.2-9, 1996.
- MITSUOKA, T. Microbes in the intestine- our lifelong partners Yakult Honsha Co., Std Tokyo, 1989, 104 p.
- MITSUOKA, T. Recente trends in research on intestinal flora. Bididobacteria and Microflora, v.1, p.3-24, 1982.
- MITSUOKA, T., Intestinal bacteria and health, Tokyo: Harcourt Brace Jovarnovich Japan, 1978, 208p.
- MITSUOKA, T., Intestinal flora and aging. **Nutr. Rev.**, v.50, 438-446, 1992.
- MODLER, H. W. Bifidogenics Factors – Sources, metabolism and **Applications. International Dairy Journal** 4, 383-407, 1994.
- MONTVILLE, T. J., WINKOWSKI, K., LUDESCHER, R. D., Models and mechanisms for bacteriocin action application. **International Dairy Journal**, 5, 797-814, 1995.
- MOREHOUSE, J., SPECIAN, R., STEWART, J., BERG, R. D. Promotion of translocation of indigenous bacteria of mice from the GI tract by oral ricinoleic acid, **Gastroenterology** 91, 673-682 (1986).
- MOUBARECK, C., GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M. J., DOUCET-POPULAIRE, F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 55, 38-44. 2005.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., KOBAYASHI, G. S. & PFALLER, M. A. Microbiologia Médica, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 135-141, 2000.
- NAKAZAWA, T., KANEKO, K., TAKAHASHI, H., INOUE, S. Neonatal meningitis caused by *Bifidobacterium breve*. **Brain & Development**, v.18, 160-162, 1996.
- NEWMANN, E., FERREIRA, C. L. L. F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct “in vitro” susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.59-65, 1995.
- NICAS, T. I., COLE, C. T., PRESTON, D. <sup>a</sup>, NAGARAJAN, R., Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant Gram positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 33, 1477-1481, 1989.

- OGAWA, M., SHIMIZU, K., NOMOTO, K., TAKAHASHI, M., WATANUKI, M., TANAKA, R., TANAKA, T., HAMABATA, T., YAMASAKI, S. AND TAKEDA, Y. Protective effect of *Lactobacillus casei ssp Shirota* on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. **Infect. Immun.** 69, 1101–1108, 2001.
- OZBAS, Z. Y., AYTAC, S. A. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria: *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. **Milchwiss**, 50, 626-629, 1995.
- PAIVA NETTO, J. V. Antibióticos e quimioterápicos em medicina veterinária. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989. 181p.
- PATHMAKANTHAN, S., MEANCE, S., & EDWARD CA. Probiotics: a review of human studies to date and methodological approaches. **Medical Ecology in Health and disease** 10-13. 2002
- PERDIGON, G., FULLER, R., RAYA, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Curr. Issues Intest. Microbiol**, 2, 27-42, 2001.
- PEREZ, P.F., MINNAARD, J., ROUVET, M., KNABENHANS, C., BRASSART, D., DE ANTONI, G.L. AND SCHIRIN, E.J. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an in vitro study. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 5037–5042, 2001.
- PODOLAK, P. K., ZAYAS, J. F., KASTNER, C. L., FUNG, D. Y. C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. **Journal of Food Protection**, 59, 370-373, 1996.
- QUINTILIANI, R. Jr, SAHM, D. F, COURVALIN, P, Mechanism of resistance to antimicrobial agents, 1999. In: MONBARECK, C., GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M. J, POPULAIRE-DOUCET, F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 55, 38-44. 2005.
- RAMOS, M. P.P, CUNHA, L.. R., MALDONADO, I. C. S. C., CARLOS, I. Z., FERREIRA, C. L. L. F. Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* na determinação das citocinas IL-4, e IL-6, INF $\gamma$ , PNF $\alpha$  e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2006 *no prelo*.



- RENNE, M., KALLIOMAKI, M., ARVILOMMI, H. Effect of probiotic and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. **Journal of Pediatrics**, v.147, 186-191, 2005.
- RIORDAN, K. O., FITZGERALD, G. F., Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. **FEMS Microbial. Lett.**, v. 156, p.259-264, 1997.
- ROBREDO, B., SINGH, K. V., BAQUERO, R., MURRAY, B. E., TORRES, C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. **Int. J. Food Microbiol.** 54, 197–204, 2000.
- SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J., MATTILA-SANDHOLM, T., Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology** 84, 197-215, 2000.
- SAAVEDRA, J. M., BAUMAN, N. A., OUNG, I., PERMAN, J. A., YOLKEN, R. H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **Lancet.**, 344: 1046-1049, 1994.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E., Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 70: 347-358, 1996.
- SATTERWHITE, T. K., EVANS, D. G., DUPONT, H. L., et al. Role of *Escherichia coli* colonisation factor antigen in acute diarrhoea. **Lancet**; 181–184, 1978.
- SCARDOVI, V. In: Sneath PHA, Mair NS, sharpe me AND Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, MD: Williams and Wilkins.,vol: 1418-1434. 1986
- SCHIFFRIN, E. J., BRASSART, D., SERVIN, A. L., ROCHAT, F., DONNET-HUGHES, A . Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strains selection. **Am. J. Clin. Nutr.** 66, 515-520, 1997.
- SEEHOFER, D., RAYES, N., SCHILLER, R., STOCKMANN, M., MULLER, A.. R., STOCKMANN, M., et al Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats. **Journal of Surgery Research** 117, 262-271, 2004.

- SERVIN, A. L., Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **Microbiology Reviews**, 28, 405-440, 2004.
- SGORBATI, B., BIAVATI, B. E PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. Em Wood, B. J. B. e Holzapfel, W. H. (eds), The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria, capítulo 8, pp. 279-306, Blackie Academic, Londres, RU. 1995.
- SHORTT, C., The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in Food Science and Technology 10, 411-417, 1999.
- SHU, Q., ZHOU, J. S., RUTHERFURD, K. J., BIRTLES, M. J., PRASAD, J., GOPAL, P. K., GILL, H. S. Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. **International Dairy Journal** 9, 831-836, 1999.
- SILVA, C.H.P.M., Bacteriologia: um texto ilustrado, Teresópolis: Eventos, p. 107-119, 1999.
- SILVA, T. M. O que são radicais livres. 2003. Acesso em 15 Fev. 2006. Disponível em <[www.medstudents.com.br/content/resumos/trabalhos\\_radicais\\_livres](http://www.medstudents.com.br/content/resumos/trabalhos_radicais_livres)>.
- SINGHAL, A, FAROOQI, I.S, O'RAHILLY, S., COLE, T.J, FEWTRELL, M., LUCAS, A. Early nutrition and leptin concentrations in later life. **Am clin Nutr**, v. 75, 993-999, 2002
- SLOCUM, M. M., SITTIG, K. M., SPECIAN, R. D. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. **American Surgeon** 58, 305-310, 1992.
- SNIJDERS, J. M., VAN LOGTESTIJN, J. G., MOSSEL, D. A. A., SMULDERS, F. J. M. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. **Veterinary Quarterly**, 7, 27-282, 1985.
- SOUZA, D. F. M. C.; FERREIRA, C. L. L. F. ; SOUZA, A. V. C., COSTA, N. M. B., YBARRA, L. M., AZEREDO, E. M. C. Translocação de *Lactobacillus acidophilus* em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico suplementada com probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 04, p. 522-526, 2004.

- SPAETH, G., BERG, R. D., PPECIAN, R. D., AND DEITCH, E. A, Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. **Surgery**, 108, 240-247, 1990.
- SPAETH. G., GOTTWALD, T., SPECIAN, R. D., MAINOUS, M. R., BERG, R. D., DEITCH, E. A. Secretory immunoglobulin A, intestinal micin, and mucosal permeability in nutritionally-induced bacterial translocation in rats. **Ann. Surg.** 220, 798, 1994.
- SREEKUMAR, O., HOSONO, A. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. **Can. J. Microbiol**, 44, 1029-1036, 2003.
- STEFFEN, E. K., BERG, R. D., and DEITCH, E. A. **J. Infect. Dis** 157, 1032-1037, 1988.
- STRUS, M., PAKOSZ, K., GOSCINIAK, H., PRZONDO-MORDARSKA, A., ROZYNEK, E., PITUCH, H., MEISEL-MIKOLAJCZYK, F. AND HECZKO, P.B. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). **Med. Dosw. Mikrobiol.** 53, 133–142, 2001.
- SUZUKI, T., ITOH, K., KANEKO, T., SUZUKI, H. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral admistration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. **J. Vet. Med. Science.** 59 (8): 665-669, 1997.
- SWANK, G. M., DEITCH, E. A., Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. **World. J. Surg.** 20, 411-417, 1996.
- SZAJEWSKA, H., MRUKOWICZ, J. Z, Probiotics in the tratament and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children. **Jornal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 33, p 17-25 2001.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W., Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40, 722-756, 1976.
- TANAKA, R., AND SHIMOSAKA, K., Investigation of the stool frequency in elderly who are bedridden and is improvement by ingesting of bifidus yorgut. **J. Geriar.** 19:577-582, 1982.

- TANNOCK. G. W. Probiotics – a critical review. England: Horizon Scientific Press, 1999, p. 5-14, 1999.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, 1990.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 292, 2001.
- TESHIMA, E. Seleção de Bactérias Bífidas Isoladas de Lactentes e Modulação da Microbiota Intestinal por Meio de Probióticos, Prebióticos e Simbióticos, Universidade Federal de Viçosa, 2001 113p. (Tese DO).
- TESHIMA, E., BORBA, L., RAMOS, M. P. P., CUNHA, L. R., FERREIRA, C. L. L. F. Bactérias Bífidas Endógenas Probióticas para Uso em Bancos de Leite Humano. I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição – A Ciência por um Brasil sem Fome. 2005.
- TICHACZEK, P. S., NISSEN-MEYER, J., NES, I. F., VOGEL, R. F., HAMMES, W. P. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatum* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. **Sys. Appl. Microbiol** 15, 460-468, 1992.
- TISSIER, H., Le Bacterium coli et le réaction chromophilr d' Escherich. C. R. Soc. Biol. 51:943, 1899.
- TORTORA G. J, FUNKE B. R, CASE C. L. Microbiologia. Ed. Artes Médicas Sul, 6ªed, Porto Alegre, 2000.
- TOSIN I. Avaliação do modo de disseminação da resistência bacteriana a antibacterianos nos hospitais brasileiros. São Paulo; s. n; [137] p. 2001.
- TOURÉ, R., KHEADR, E., LACROIX, C., MORONI, O., FLISS, I Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal od Apllied Microbiology**, 95, 1058-1069, 2003.
- TOZZI, A.E, PEZZOTTI, P., GRECO, D., Does breastfeeding delay progression to AIDS in HIV-infected children? **AIDS**, v.4:1, 293-400, 1990.
- VASSEUR, C., BAVAREL, L., HEBRAUD, M., LABADIE, J., Effect of osmotic alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inihibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, 86, 469-476, 1999.

- VELRAEDS, M. C., VAN DER MEI, H. C., REID, G., BUSSCHER, H. J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 1958–1963, 1996.
- VIEIRA, G. O., SILVA, L. R., VIEIRA, T. O. Alimentação infantil e morbidade por diarreia. **J. Pediatr**, 79(5), 449-454, 2003.
- WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**; 406: 775-81, 2000.
- WELLS CL. Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 58: 87–93, 1990.
- WELLS, C. L., JECHOREK, R. P., ERLANDSEN, S. L. Inhibitory effects of bile on bacterial invasion of enterocytes: possible mechanism for increased translocation associated with obstructive jaundice. **Critical Care Medicine** 23, 301-307, 1995.
- WELLS, C. L., MADDUS, M. A., SIMMONS, R. L. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. **Archives of Surgery** 122, 48-53, 1987.
- WIEST, R., RATH, H. C. Bacterial Translocation in the Gut. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** vol 17, nº 73, 397-425, 2003.
- WILLIAMS, R., STEHLIN, I., Breast milk or formula: making the right choice for your baby, Adapted from FDA consumer, 2005.
- WILMORE, D. W., SMITH, R. J., O'DWYER, S. T., JACOBS, D. O., ZIEGLER, T. R., WANG, X. The gut: a central organ after stress. **Surgery** 104, 917-923, 1988.
- WORK GROUP ON BREASTFEEDING AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 100, 1035-1039, 1997.
- WRIGHT, A. V, Regulating the Safety of Probiotics. The European Approach. **Current Pharmaceutical Design**, 11, 17-23. 2005.
- YASID, A. M, ALI, A. M, SHUHAIMI, M., KALAIVAANI, V., ROKIAH, M. Y., REEZAL, A. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Letters in Applied Microbiology** 31, 57-62, 2000.

- YASUI, H., Shida, K., Matsuzaki, T. and Yokokura, T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek** 76, 383–389, 1999.
- YILDIRIM, Z., JOHNSON, M. G., Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal Food Protection**, 61, 47-51, 1998.
- YILDIRIM, Z., WINTERS, D. K., JOHNSON, M. G. Purification amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Applied Microbiology**, 86, 45-54, 1999.
- YIM HÁ, G., YANG, C. H., KIM, H., CHONG, Y. Case of sepsis caused by *Bifidobacterium longum*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, 1227-1228, 1999.
- YOLKEN, R.H, PETERSON, J.A VONDERFECHT, S.L., FOUTS, E. T, MIDDTHUN, NEWBURG, D.S. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. **J. Clin. Invest**, v. 90, p.1984-1991, 1992.
- YOUNG, R. J., HUFFMAN, S., Probiotic Use in Children . **Journal Pediatric Health Care**. 17 p 277-283, 2003.
- ZHOU, J. S, PILLIDGE, C. J, GOPAL, P. K, GILL, H. S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology** 98, 211-217. 2005.
- ZHOU, J. S., SHU, Q., RUTHERFURD, K. J., PRASAD, J., GOPAL, P. K., GILL, H. S. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of Lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology** 38, 153-161, 2000a.
- ZHOU, J. S., SHU, Q., RUTHERFURD, K. J., PRASAD, J., GOPAL, P. K., GILL, H. S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology** 56, 87-96, 2000b.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)