

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DE MICROORGANISMOS

THALIS FERREIRA DOS SANTOS

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU
(*THEOBROMA CACAO*) EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL**

ILHÉUS
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DE MICRORGANISMOS

THALIS FERREIRA DOS SANTOS

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU (*THEOBROMA CACAO*) EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, para a obtenção do título de Mestre em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Romano.

ILHÉUS
2010

THALIS FERREIRA DOS SANTOS

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU (*THEOBROMA*
CACAO) EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL

Banca examinadora para obtenção do grau de mestre:

Prof. Dra. Adriana Pardini Vicentini Moreira
Membro externo - Instituto Adolfo Lutz

Prof. Dra. Rachel Passos Rezende
Membro Interno - UESC

Prof. Dra. Carla Cristina Romano
Presidente da banca - UESC

*À minha mãe, Zenilde e ao meu
irmão, Rodrigo, as duas pessoas
que acreditam que eu posso ir
além do que eu mesmo imagino...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e sustentador da minha vida, do universo e de toda ciência.

Aos meus pais, que com tanto amor deram bem mais do que eles tinham para que eu chegasse até aqui. Nunca poderei retribuir, mas aqui vai o meu AMO VOCÊS!

A Rodrigo, meu irmão e melhor amigo! Sem você tudo seria menos divertido... Obrigado por tudo. Também te amo, abusado!

À minha orientadora, Professora Carla Romano, por dividir um pouco do seu grande conhecimento, pela generosidade, compreensão e auxílio nesse árduo processo de se tornar mestre.

Ao professor João Carlos Teixeira Dias por me deixar tão à vontade no laboratório de Monitoramento Ambiental.

A professora Rachel Passos Rezende, pela colaboração, por abrir as portas do laboratório de Biotecnologia Microbiana e pela atenção e carinho sempre demonstrados.

Ao professor Fábio Flores pela colaboração na parte histológica.

A Bianca Maciel, pelo apoio no estágio em docência e as dicas preciosas no laboratório, além do halotano, claro! rs...

Aos professores do PPGBBM, por nos darem as ferramentas pra seguirmos nossa caminhada científica com autonomia.

Aos colegas de mestrado, Bianca, Cintia, Adriana, Denise, Flavia, Leo, Samuel, Pedro, Gis, Gílvia, Lucas, Tatiane, Renata e Flamélia. Foi um prazer e uma honra ser colega de vocês. Desejo que todos sejam bem sucedidos onde quer que forem. Aquele abraço!

Aos companheiros de laboratório e grandes amigos Denise, Gis, Salatiel, Tauá, Louise e Marcos. Os dias, noites, sábados, domingos e feriados no laboratório deixarão saudade por causa de nossas resenhas, brincadeiras, discussões, músicas... Ah! Muita saudade!

Aos meus tios, tias, primos, primas e avós, pelo carinho e torcida sempre demonstrados. Obrigado por tudo! Vocês são essenciais!

Aos meus grandes amigos de ontem, hoje e sempre, Renata, Jacq, Fernanda, Denise, Gis, Juliana, Evandro, Arlindo, Samille... Muito obrigado por poder contar com vocês! Em diferentes momentos da minha vida foram vocês que me divertiram, me ensinaram, me ouviram, me apoiaram... Amo vocês, queridos amigos!

A Junior Miranda. Impossível explicar com palavras o que representou seu apoio nesses dois anos de mestrado. Essa conquista é nossa!

Aos membros da Igreja Batista Ebenézer, pelo imenso carinho demonstrado por mim e minha família.

A todas as pessoas cujos cargos, funções ou ocupações contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

A UESC por viabilizar a realização desse projeto de vida.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

O esforço é perfeito, imperfeita é a obra.

RESUMO

Probióticos são microrganismos, que quando administrados em quantidade adequada, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Devem possuir como características principais a capacidade de resistência à passagem pelo trato intestinal, segurança, boas propriedades tecnológicas e aderência ao muco e células epiteliais. Agem competindo por nutrientes e sítios de fixação, produzindo substâncias com capacidade antimicrobiana e modulando o efeito imune. Historicamente, os probióticos são isolados da microbiota humana, no entanto o potencial probiótico de microrganismos de outras fontes vem sendo testado. A fermentação do cacau é uma fonte conhecida de bactérias lácticas, o principal grupo microbiano usado em preparações probióticas. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de bactérias lácticas do cacau em modelo de colite experimental. Oitenta isolados de bactérias lácticas divididos aleatoriamente em oito *pools*, além de uma linhagem isolada, compuseram nove soluções lácteas fermentadas contendo 10^9 UFC/mL. O potencial probiótico desses microrganismos foi testado em ratos wistar, que desenvolveram um processo de colite induzido pela injeção intra-retal de ácido acético. A remissão da colite foi avaliada a partir da contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos, dosagem de citocinas e IgA séricas e análise histológica, em comparação com um controle com colite mas sem tratamento. A capacidade das bactérias lácticas resistirem ao ambiente gástrico foi testada. À exceção do grupo que recebeu a linhagem isolada (G9), todos os grupos mostraram algum grau de redução na contagem de neutrófilos e monócitos. Os grupos G1 e G2 se destacaram com uma diminuição pronunciada dessas células, que estão envolvidas no desenvolvimento do processo inflamatório. Não houve diferença significativa na contagem de eosinófilos. O grupo que recebeu a solução contendo apenas uma linhagem apresentou redução de 25% do número de linfócitos em comparação ao controle com colite (C1). Os grupos G1, G2, G7 e G8 exibiram uma redução expressiva da concentração sérica de IFN- γ . Nenhum dos grupos apresentou redução significativa de TNF- α . Os grupos G4, G7 e G8 tiveram seus níveis séricos de IL-10 elevados em relação ao controle sem colite e sem tratamento (C2). Apenas o grupo G2 apresentou elevação significativa na concentração de IgA, mas os outros grupos, à exceção de G9, que se mostrou similar ao controle C1, exibiram tendência à elevação. A análise histológica revelou variação na remissão do dano tecidual. O grupo 1 se destacou com pronunciada diminuição do infiltrado inflamatório, e G9 pela exacerbação desse processo. As bactérias lácticas usadas nesse estudo mostraram-se sensíveis a 30 minutos de exposição ao suco gástrico simulado. No entanto, após 2 horas, alguns grupos ainda apresentaram 10^7 a 10^8 UFC/mL. A redução na contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos e da concentração sérica de citocinas inflamatórias indica o potencial antinflamatório das linhagens de bactérias lácticas usadas nesse estudo. A elevação de IL-10, verificada em alguns grupos, é importante na constatação da indução de um perfil regulatório. A IgA, importante na proteção das superfícies mucosas contra a invasão microbiana, pode estar envolvida no processo de remissão da colite. A utilização de apenas uma linhagem microbiana parece não ter tido efeito sobre a inflamação. Os resultados ora apresentados registram o potencial probiótico das bactérias lácticas do cacau, e apontam a possibilidade de novos estudos que acessem as demais características inerentes a um microrganismo probiótico.

PALAVRAS-CHAVE: Probiótico, Bactérias Lácticas, Colite, Fermentação do cacau.

ABSTRACT

Probiotics are microorganisms that when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host. They have as main features the ability to resist passage through the intestinal tract, security, good technological properties and adhesion to mucus and epithelial cells. They act by competing for nutrients and attachment sites, produce substances with antimicrobial activity and modulate the immune effect. Historically, probiotics are isolated from the human microbiota, but the probiotic potential of organisms from other sources has been tested. The cocoa fermentation is a known source of lactic acid bacteria, the main microbial group used in probiotic preparations. This study aimed to evaluate the potential probiotic of cocoa lactic acid bacteria in a model of experimental colitis. Eighty isolates of lactic acid bacteria randomly divided into eight pools, and a strain isolated, made up nine fermented solutions containing 10^9 CFU/mL. The potential probiotic of organisms was tested in rats wistar, which developed a process of colitis induced by intrarectal injection of acetic acid. Remission of colitis was assessed by blood leukocytes total and differential counting, serum cytokines and serum IgA and histological analysis, compared to a control with colitis, without treatment. The ability of lactic acid bacteria resist the gastric environment was tested. Except for the group that received the strain isolated (G9), all groups showed some degree of reduction in neutrophils and monocytes. The G1 and G2 stood out with a pronounced decrease in these cells, which are involved in the development of inflammation. There was no significant difference in eosinophil counts. The group that received the solution containing only one strain showed reduction (25%) in the number of lymphocytes compared to control with colitis (C1). The G1, G2, G7 and G8 groups showed a significant reduction in serum IFN- γ . Neither group showed significant reduction of TNF- α . Serum levels of IL-10 of the groups G4, G7 and G8 were high compared to the control without colitis and without treatment (C2). Only G2 group showed a significant increase in the concentration of IgA, but other groups, except for G9, which proved to be similar to the control C1, exhibited a tendency to rise. Histological analysis revealed variation in the remission of tissue damage. G1 group stood out with pronounced decrease in the inflammatory infiltrate and G9 by the exacerbation of this process. Lactic acid bacteria used in this study were sensitive to 30 minutes of exposure to simulated gastric juice. However, after 2 hours, some groups still had 10^7 to 10^8 CFU/mL. The reduction in total and differential counts of leukocytes and blood serum concentration of inflammatory cytokines indicates the anti-inflammatory potential of lactic acid bacteria used in this study. The elevation of IL-10, observed in some groups, is important in establishing the induction of a regulatory profile. IgA is important in protecting mucosal surfaces against microbial invasion, may be involved in the process of remission of colitis. The use of only one microbial strain seems to have no effect on inflammation. The results presented here record the potential probiotic of cocoa lactic acid bacteria. Other studies are needed to access other characteristics of a probiotic microorganism.

KEY-WORDS: Probiotic, Lactic Bacteria, Colitis, Cocoa fermentation

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1. PROBIÓTICOS.....	13
1.1. CONCEITOS.....	13
1.2. PROPRIEDADES.....	14
1.3. EFEITOS E MECANISMOS DE AÇÃO.....	18
2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	22
3. FERMENTAÇÃO DO CACAU.....	24
4. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	26
JUSTIFICATIVA.....	32
ARTIGO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIAL AND METHODS.....	36
RESULTS.....	39
DISCUSSION.....	41
REFERENCES.....	45
GRAPHICS, TABLE AND PICTURES.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

INTRODUÇÃO

O cientista russo Elie Metchnikoff, no início do século XX, ao publicar os trabalhos “The nature of man: studies in optimistic philosophy” (1903) e “The prolongation of life: optimistic studies” (1907) lançou a idéia de que a saúde e bem estar do homem estão relacionados à sua dieta. A partir de seus estudos, concluiu que o cólon humano era habitado por uma microbiota “intoxicante” que levaria à morte prematura. Ele então propôs que uma dieta rica em leite e seus derivados estimularia o crescimento de bacilos lácticos e a conseqüente acidificação do meio diminuiria essa microbiota dita intoxicante. Assim, tornou-se um precursor do conceito de microrganismos probióticos como promotores de bem estar (Kauffman, 2008). Desde então suas idéias tem influenciado gerações de cientistas e produtores alimentícios no desenvolvimento de formulações que contenham os microrganismos capazes de modificar a microbiota intestinal.

O grande interesse científico e comercial sobre os probióticos vêm da variedade de efeitos que eles podem ter sobre a saúde. Estudos diversos têm fornecido evidências clínicas dos benefícios gerados pelos probióticos em numerosas condições, como por exemplo, diarreia aguda, intolerância à lactose, doenças inflamatórias intestinais, e efeitos adversos do uso de antibióticos. Além das afecções associadas ao trato gastrointestinal, também tem sido mostrado sua utilidade no tratamento de alergias, câncer, asma, hipercolesterolemia, cirrose e infecções do ouvido e trato geniturinário (Roos *et al.*, 2000; Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2007; Hord, 2008).

A Organização Mundial da Saúde define probióticos como microrganismos vivos capazes de conferir um efeito benéfico à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (Joint FAO/WHO, 2002). Bactérias do gênero *Lactobacillus* são

principalmente usadas para esse fim, mas também bactérias não lácticas e leveduras têm sido utilizados como probióticos. O mecanismo pelos quais esses microrganismos agem ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que eles inibem o crescimento de microrganismos patogênicos através da produção de bacteriocinas e ácidos orgânicos; competem com patógenos por sítios de adesão e nutrientes; e modulam o sistema imune, através da interação com receptores das células epiteliais, que reconhecem padrões moleculares na superfície desses organismos (Parvez *et al.*, 2006).

A escolha de um microrganismo para ser usado como probiótico depende de alguns fatores como resistência ao pH ácido estomacal, enzimas pancreáticas e bile, o que favorecerá sua sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal. Além disso devem ser capazes de aderir à mucosa intestinal para que a colonização seja bem sucedida, não devem exibir patogenicidade e precisam ser resistentes aos processos de fabricação e estocagem do alimento (Ouwehand *et al.*, 2002).

Historicamente, os organismos usados como probióticos foram isolados da própria microbiota humana, no entanto o crescente interesse no desenvolvimento de produtos funcionais tem impulsionado a busca por novas fontes desses microrganismos. Nesse sentido, muitos trabalhos têm identificado o potencial probiótico de bactérias isoladas principalmente de produtos vegetais e lácteos (Lei *et al.*, 2004; Todorov *et al.*, 2008).

O processo fermentativo do cacau, principal matéria-prima do chocolate, é uma fonte conhecida de bactérias ácido-lácticas (BAL), destacando-se o gênero *Lactobacillus*, predominantemente achado em trabalhos que investigam a diversidade desse grupo bacteriano (Shwan *et al.*, 2004). Sabendo-se que os efeitos à saúde por parte dos microrganismos considerados probióticos são linhagem dependentes, torna-se importante a prospecção de novas linhagens que exibam potencial para ser usadas no desenvolvimento de alimentos funcionais. Dessa forma, esse trabalho buscou acessar o potencial probiótico de bactérias

láticas isoladas da fermentação do cacau, testando sua resistência ao pH gástrico e sua capacidade de reverter o processo inflamatório num modelo experimental de colite.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PROBIÓTICOS

1.1 – CONCEITO

A palavra próbiótico, de origem grega, significa literalmente pró vida, ou pela vida. Schrezenmeir e de Vrese (2001) e Sanders (2009) descreveram o histórico do uso desse termo, que foi empregado pela primeira vez em 1965, e desde então vem tendo sua definição reformulada ou adaptada conforme novas descobertas de suas aplicações ou efeitos. Ele já foi usado para definir substâncias ou extratos teciduais que estimulariam o crescimento microbiano, numa aplicação oposta à ação dos antibióticos. Em 1989, a definição se aproximou da que é usada atualmente, se referindo aos probióticos como “microrganismos vivos adicionados a alimentos, que afetariam benéficamente o hospedeiro por promover o equilíbrio da microbiota intestinal”. Esse conceito básico vem sendo adaptado por diversos pesquisadores, os quais destacaram:

- que o termo pode se referir a apenas um microrganismo ou uma mistura (Timmerman *et al.*, 2004);
- os benefícios causados devem ir além da nutrição (Guarner *et al.*, 1998);
- a quantidade adequada para alcançar os efeitos desejados (Guarner *et al.*, 1998);
- a necessidade ou não desses microrganismos serem administrados em produtos lácteos (Prado *et al.*, 2008);

- os efeitos não apenas sobre a microbiota intestinal, mas sobre a imunidade sistêmica e mucosa (Naidu *et al.*, 1999);
- a necessidade ou não da viabilidade desses microrganismos (Isolauri *et al.*, 2002);
- a obrigatoriedade da origem humana das linhagens (Dunne *et al.*, 2001).

A FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) define probióticos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

A pesquisa em torno desses organismos, suas aplicações clínicas e mecanismos de ação vem crescendo, o que torna possível que com as novas descobertas as definições sejam reavaliadas.

1.2 – PROPRIEDADES

A escolha de um microrganismo para ser utilizado como probiótico depende da expressão de certas propriedades que estão intrinsecamente ligadas aos seus efeitos. Eles devem ser resistentes às condições adversas do trato gastrintestinal, sendo assim, devem tolerar as enzimas proteolíticas, o pH ácido do estômago e os sais biliares. Além disso, devem ser capazes de aderir à mucosa intestinal, serem seguros, ou seja, não patogênicos, e terem potencial tecnológico.

Em torno de 2,5 litros de suco gástrico é secretado por dia, tendo um pH de aproximadamente 2. Dessa forma a passagem pelo estômago é uma barreira importante no trânsito dos microrganismos em direção ao intestino (Charteris *et al.*, 1998). A necessidade da procedência humana dos probióticos pressupõe que espécies bacterianas que fazem parte da microbiota normal teriam mais chances de sobreviver às condições adversas do trato gastrintestinal. As bactérias lácticas são conhecidas por resistirem ao pH 4,5, que é a acidez

da maioria dos produtos fermentados por esses microrganismos. Para acessar a resistência das linhagens candidatas, testes *in vitro*, com simulações do suco gástrico, são utilizados, os quais apresentam limitações e nem sempre são bons indicadores de potencial probiótico, já que alguns microrganismos testados exibem baixa resistência ao pH gástrico, mas em testes *in vivo* demonstram excelente ação probiótica. Em geral, as linhagens testadas exibem tolerância variada ao ácido, podendo apresentar resultados contrastantes dentro da mesma espécie. Valores de pH abaixo de 3 geralmente são críticos e as bactérias expostas a essas condições podem ter seu crescimento inibido ou perderem a viabilidade (Jacobsen *et al.*, 1999; Brizuela *et al.*, 2001; Coeuret *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2005; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Golowczyc *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2008; Zoumpopoulou *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Lahtinen *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2009; Musikasang *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2009). A sobrevivência em pH 3 é significativa, posto que a ingestão de produtos lácteos ou outros alimentos podem diminuir a acidez estomacal. Além disso, a influência de proteínas do leite e da própria mucina na resistência durante a passagem pelo estômago tem sido relatada (Charteris *et al.*, 1998; Vinderola *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2005).

A bile é uma secreção digestiva que desempenha o papel de emulsificar e solubilizar lipídeos. Essa característica afeta os fosfolipídios e proteínas das membranas celulares. Assim, microrganismos probióticos ou patogênicos precisam resistir à bile para colonizar o intestino. Muitos autores investigando o potencial probiótico de bactérias isoladas de origem animal, vegetal e produtos fermentados encontraram resultados variáveis com relação à tolerância a secreção biliar. Concentrações entre 0,1 e 2% de *oxigall bile*, um produto derivado da bile bovina, vêm sendo testadas. As linhagens em geral apresentam resistência, no entanto podem ter seu crescimento retardado na presença de concentrações mais altas. A capacidade de tolerar a bile também é uma propriedade que pode variar intraespecificamente

(Jacobsen *et al.*, 1999; Brizuela *et al.*, 2001; Coeuret *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2003; Begley, 2005; Mishra *et al.*, 2005; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Golowczyc *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2008; Zoumpopoulou *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Lahtinen *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2009; Musikasang *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2009).

A adesão à mucosa intestinal é uma etapa importante na ação dos probióticos, já que isso permitirá a resistência ao fluxo intestinal favorecendo a colonização, além de promover a interação com receptores celulares, e saturação dos sítios de ligação de patógenos (Ouwehand *et al.*, 2002). Diversos modelos são usados para testar o potencial de adesão dos probióticos como, por exemplo, porções de tecido intestinal, linhagens celulares, principalmente Caco-2 e HT29, e o próprio muco (Laparra *et al.*, 2009). Os graus variáveis nos índices de adesão podem estar relacionados às limitações das metodologias. (Chauviere *et al.*, 1992; Servin *et al.*, 2003; Morelli *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2005). Com relação aos efeitos benéficos verificados pelo uso de microrganismos que apresentam baixa capacidade de adesão, sugere-se que apenas o trânsito do microrganismo seria capaz de proporcionar a ação probiótica. No entanto, um probiótico ideal deveria ser capaz de aderir, replicar e colonizar o intestino.

Classicamente, os lactobacilos, principal grupo de microrganismos usados no desenvolvimento de produtos probióticos, são considerados seguros, o que é corroborado por serem parte da microbiota normal humana e largamente usados em produtos alimentícios, como probióticos e organismos *starter*. No entanto, o achado de *Lactobacillus* em ocorrências clínicas traz à tona a necessidade de investigar sua importância como possível patógeno. Na maioria dos achados clínicos é impossível determinar se os isolados são contaminantes ou reais causadores de infecções (Cannon *et al.*, 2005), e são raros os casos de associação entre o consumo de probióticos e a ocorrência de infecções. Teoricamente, eles podem ser responsáveis por infecções sistêmicas como endocardite, alterações metabólicas e indução de resistência a antibióticos através da transferência gênica. É importante ressaltar que o aumento

no consumo de probióticos não tem levado a um crescimento do número de casos (Borrielo *et al.*, 2003). Reconhecendo a importância da segurança de microrganismos adicionados a alimentos, a FAO/WHO recomenda testes básicos a serem realizados para garantir a não-patogenicidade das linhagens usadas como probióticos, entre eles pode-se citar a determinação do padrão de resistência a antibióticos, análise da possível translocação do sítio intestinal, investigação de atividades metabólicas e efeitos adversos durante estudos em humanos, além de avaliação da produção de toxinas ou potencial hemolítico, no caso da linhagem pertencer a uma espécie conhecida por produzir toxinas e ter atividade de hemólise. Recomenda-se ainda que sejam feitos testes em animais imunocomprometidos.

Além de terem seus efeitos à saúde comprovados, os probióticos devem apresentar boas propriedades tecnológicas, como tolerância ao oxigênio e capacidade de produção em larga escala, para que sejam comercializáveis. Apesar das características peculiares de cada linhagem, fatores como condições da fermentação, temperatura de estocagem, composição química da matriz do alimento podem afetar a viabilidade dos microrganismos durante o tempo de prateleira ou levar o microrganismo a interferir nas propriedades do produto, alterando o *flavor* (Shah, 2000; Vinderola *et al.*, 2000; Georgieva *et al.*, 2009). Outro aspecto importante é a interação entre os probióticos e os organismos *starter* em produtos fermentados (Vinderola *et al.*, 2002, Heller, 2001). Por vezes os microrganismos podem exibir um comportamento antagonista através da produção de bacteriocinas ou ácidos orgânicos que inibam o crescimento de outros (Heller, 2001). Apesar de a produção de antimicrobianos ser uma característica desejável em probióticos (Todorov *et al.*, 2009), ela pode limitar a combinação de linhagens (Joseph *et al.*, 1998).

Em decorrência da popularização dos produtos probióticos torna-se imprescindível a atuação de cientistas e fabricantes no sentido de investigar e assegurar a manutenção das

propriedades desses microrganismos, para que os efeitos atribuídos às referidas linhagens sejam alcançados.

1.3 – EFEITOS E MECANISMOS DE AÇÃO

Os probióticos são conhecidos principalmente por seu potencial no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal. Nesse sentido, linhagens de *Lactobacillus* e outros gêneros de microrganismos têm tido sua eficácia comprovada no tratamento de afecções intestinais.

Entre os efeitos principais pode-se citar:

- a redução ou profilaxia da diarreia associada ao uso de antibióticos, usando principalmente linhagens de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Saccharomyces boulardii* (Arvola *et al.*, 1999; Szajewska *et al.*, 2006; Doron *et al.*, 2008);
- tratamento ou encurtamento do tempo de diarreia causada por rotavírus (Isolauri *et al.*, 1991; Juntunen *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2009);
- redução da colonização por *Helicobacter pylori* (Midolo *et al.*, 1995; Cats *et al.*, 2003);
- diminuição dos sintomas associados à intolerância a lactose (Szilagyi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2008);
- diminuição na colonização por enteropatógenos (Bibiloni *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2001; Cross, 2002; Wine *et al.*, 2009);
- redução dos sintomas e da reincidência das doenças inflamatórias intestinais (Brigidi *et al.*, 2001; Damascos, 2008; Dieleman *et al.*, 2003; Nishitani *et al.*, 2009);
- diminuição do risco de câncer de cólon (Leu *et al.*, 2005; Fotiadis *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009);

Similarmente, a administração de produtos probióticos tem sido associada com o decréscimo do risco de condições sistêmicas tais como asma, alergia, câncer e aterosclerose, além de infecções em outros sítios (Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2007).

Os mecanismos de ação dos probióticos administrados oralmente não estão completamente definidos. No entanto, sabe-se que eles podem ter efeito direto sobre outros microrganismos, através da produção de antimicrobianos e competindo por sítios de ligação e nutrientes, ou mesmo inibindo a produção de toxinas. Os sinais gerados pelos probióticos podem ter ainda efeitos sobre o sistema imune, auxiliando no controle de patógenos ou atenuando processos inflamatórios patológicos (Cross, 2002)

Substâncias produzidas por lactobacilos tem tido sua atividade antimicrobiana atestada, a exemplo de ácido láctico e peróxido de hidrogênio (Pridmore *et al.*, 2008; Voulgari *et al.*, 2010). Diferentes espécies desse gênero também produzem bacteriocinas de alto e baixo peso molecular. *Lactobacillus salivarius* UCC118 produz a bacteriocina Abp118 que têm atividade contra *Listeria monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007); *L. sake*, isolado de uma variedade de queijo fermentado chinês, mostrou produzir um composto de amplo espectro antibacteriano; Dimitrijevic *et al.* (2009) identificou a rhamnosina A, produzida por *L. rhamnosus*, que inibiu o crescimento de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698; a reuterina, uma das mais bem estudadas bacteriocinas produzidas por probióticos, isolada de *Lactobacillus reuteri*, tem ação não apenas sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas como também sobre fungos, protozoários e vírus (Cleusix *et al.*, 2008). Compostos produzidos por outros gêneros de bactérias lácticas com atividade antimicrobiana sobre diversos patógenos também tem sido identificados (Hosseini *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2009).

Os probióticos podem agir sobre patógenos, competindo por nutrientes. Um exemplo desse mecanismo é a competição por ferro, o qual precisa estar disponível no meio para a

maioria dos microrganismos, à exceção dos lactobacilos (Weinberg, 1997), sendo assim, a limitação desse nutriente já confere uma vantagem em relação aos agentes patogênicos. *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* são capazes de ligar o ferro em sua parede celular tornando-o indisponível para outros microrganismos (Elli *et al.*, 2000). O probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917, expressa sistemas de absorção de ferro para incorporação em sua parede celular. Outros microrganismos, inclusive patógenos, expressam sistemas semelhantes, no entanto, sua vantagem está no fato de codificar pelo menos sete sistemas para esse fim (Grozdanov *et al.*, 2004; Grobe *et al.*, 2006).

A adesão às células epiteliais é um passo importante para o estabelecimento de infecções. As bactérias probióticas também possuem a propriedade de aderir ao epitélio, por isso teriam a capacidade de competir e inibir a ligação dos organismos patogênicos. A habilidade de adesão dos probióticos têm sido investigada em vários modelos *in vitro* usando principalmente a linhagem celular Caco-2. Alguns trabalhos mostram que diferentes linhagens de *Lactobacillus* são capazes de inibir a ligação de *Salmonella* spp e *E. coli* a células intestinais (Collado *et al.*, 2007; Jankowska *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Além do processo de competição, a inibição da adesão pode ser mediada por outros mecanismos como o aumento na produção do muco (Mack *et al.*, 2003), a produção de fatores protéicos que inibem a adesão (Fujiwara *et al.*, 1999), co-agregação (Kos *et al.*, 2003; Bujňáková *et al.*, 2004) e indução de biosurfactante (van Hoogmoed *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2004).

A ação de certos microrganismos probióticos reside em sua capacidade de proteger o hospedeiro da ação de toxinas produzidas por patógenos. Chen *et al.* (2006) mostrou que *Sacharomyces bouladii* é efetiva contra a toxina A de *Clostridium difficile*, através de sua interferência na cascata de sinalização gerada pela toxina; A toxina Shiga 2 de *E. coli* teve seus níveis de expressão reduzidos após co-incubação com diversas linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Carey *et al.*, 2008); Asahara *et al.* (2004) mostrou que o

ácido acético produzido por *Bifdobacterium breve* pode estar relacionado com a inibição da expressão da toxina Shiga produzida por *E. coli* (STEC) O157:H7; o probiótico *Clostridium butyricum* MIYAIRI também foi capaz de proteger camundongos dos efeitos dessa mesma toxina através da ação dos ácidos láctico e butírico, além de reduzir a viabilidade da STEC (Takahashi *et al.*, 2004). Probióticos também podem ter papel antagônico contra toxinas fúngicas. Estudos têm mostrado que a natureza dessa ação é a interação entre o microrganismo e a toxina e não sua inativação. *L. rhamnosus* GG liga a micotoxina deoxinivalenol, restringindo sua biodisponibilidade. Esse efeito é observado quando a bactéria está viável ou não (Turner *et al.*, 2008). Gratz *et al.* (2006) mostrou, em um experimento usando ratos, que essa mesma linhagem diminuiu a toxicidade e os danos hepáticos causados pela aflatoxina, a partir da ligação desta ao probiótico. Tem sido mostrado ainda que *L. rhamnosus* GG exerce proteção contra os danos à membrana e ao DNA, causados pela aflatoxina (Gratz *et al.*, 2006).

Microrganismos probiótico podem de influenciar o sistema imune do hospedeiro através de produtos de seu metabolismo, componentes da parede celular e DNA. A interação do microrganismo e seus produtos com o epitélio é um passo importante na modulação da resposta imunológica. O probiótico precisa interagir com receptores das células epiteliais ou de células do sistema imune associado à mucosa para desencadear uma cascata de sinalização, levando à modulação do efeito imune. Uma vez recebido o sinal, eles são transduzidos por mediadores como NF- κ B e STAT. Então as células epiteliais, os linfócitos T, as células dendríticas e/ou os macrófagos intestinais respondem ao estímulo liberando citocinas inflamatórias como IL-12, IFN- γ , TNF- α ou citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF- β , dependendo da linhagem administrada (Cario *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2007). Outros efeitos relacionados à modulação imunológica são a ativação dos receptores NOD, levando a um aumento na produção de defensinas pelas células de Paneth, que em última instância

moldam o perfil da microbiota intestinal (Salzman *et al.*, 2007); a elevação mucosa e sistêmica de títulos de anticorpos; acentuação da capacidade fagocítica de macrófagos (Perdigon *et al.*, 1991; Perdigon *et al.*, 1995, Macpherson *et al.*, 2004); e aumento da atividade das células NK (Takeda *et al.*, 2006).

Os efeitos anti-cancerígenos dos microrganismos probióticos despertam grande interesse, mas sua natureza não está completamente elucidada. Evidências mostram que os probióticos podem metabolicamente inativar substâncias com potencial carcinogênico e inibir o crescimento de certos grupos microbianos que ativam compostos pró-cancerígenos. Além desses efeitos diretos, eles também alteram a resposta imune celular antitumoral (Liong *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009).

O potencial dos probióticos para diminuir os níveis séricos de colesterol é alvo de diversos estudos devido à grande incidência de doenças cardíacas. O mecanismo de ação proposto está relacionado à capacidade das bactérias lácticas de desconjugar os ácidos biliares, que uma vez desconjugados precipitam com o colesterol. O fígado então compensa a perda dos ácidos biliares convertendo colesterol em bile (Kießling *et al.*, 2002).

A despeito da extensiva busca da natureza da ação probiótica, pouco se sabe sobre as bases moleculares envolvidas nos seus efeitos sobre a saúde. A elucidação dessas questões ajudará na seleção e combinação de linhagens com efeito específico sobre determinada patologia.

2. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)

As bactérias lácticas compreendem um grupo heterogêneo de microrganismos, cuja principal característica é a capacidade de fermentar uma variedade de substratos produzindo ácido láctico. Destacam-se por serem gram-positivas, não-esporulantes e tolerantes ao ácido.

Podem ser classificadas ainda, quanto ao produto final da sua fermentação. Quando produzem apenas ácido láctico denomina-se homofermentadoras, ou heterofermentadoras quando além deste, podem produzir ácido butírico, fórmico, acético, etanol, entre outros. Elas são consideradas mesofílicas, apesar de que certas linhagens podem crescer em temperaturas mais baixas como 5°C ou mais altas como 45°C. Podem crescer em pH tão baixo quanto 4,5 ou em condições ainda mais ácidas a exemplo de alguns probióticos (Pedersen *et al.*, 2005; Klaenhammer *et al.*, 2005).

Bactérias lácticas são encontradas dispersas no ambiente, e comumente são isoladas de produtos lácteos, carnes, cereais, entre outros (Chen *et al.*, 2005; Zamudio-Maya *et al.*, 2006; Cenci-Goga *et al.*, 2008; Najjari *et al.*, 2008). Esses microrganismos, especialmente os lactobacilos, são parte da microbiota intestinal de quase todos os animais, onde eles contribuem para diversas funções como manutenção da integridade da mucosa, diferenciação celular, proteção contra patógenos e imunomodulação (Magalhães *et al.*, 2007; Hord, 2008).

Tradicionalmente as bactérias lácticas são usadas como organismos *starter* na fermentação de diversos produtos, principalmente leite e derivados. Além de preservar o alimento, devido a redução do pH e produção de substâncias antimicrobianas, seu metabolismo contribui para o *flavor* do produto fermentado (Smit *et al.*, 2007).

As bactérias lácticas recebem especial atenção devido a seu potencial para serem usadas como ferramenta genética. Diversas espécies têm tido seus genomas seqüenciados e os genes responsáveis por suas características, principalmente relacionadas aos efeitos sobre a saúde, vem sendo identificados (Konings *et al.*, 2000). Algumas linhagens foram modificadas para servirem como vetores de vacinas ou como biofábricas produzindo substâncias como a citocina IL-10, por exemplo (Steidler *et al.*, 2000).

A grande diversidade desse grupo faz com essas bactérias possam habitar inúmeros nichos, sendo indispensáveis tanto nos diferentes processos fermentativos em que toma parte,

quanto como membro da microbiota intestinal de humanos e outros animais. O entendimento de sua genética e fisiologia poderá ajudar a esclarecer os mecanismos pelos quais as bactérias lácticas agem em processos patofisiológicos humanos e a bioquímica de sua fermentação.

3. FERMENTAÇÃO DO CACAU E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

O cacauero (*Theobroma cacao*) é cultivado na zona equatorial, principalmente nos países Costa do Marfim, Brasil e Gana. Seu fruto, o cacau, abriga as amêndoas que são a principal matéria prima do chocolate (Schwan *et al.*, 2004; Kostinek *et al.*, 2008). As amêndoas do cacau estão envoltas em uma polpa mucilaginosa que contem além de ácidos orgânicos, açúcares e pectina, e seu pH é de aproximadamente 3,5 (Schwan *et al.*, 1998). Elas originalmente possuem um sabor adstringente e precisam ser fermentadas, secas e torradas para adquirirem as características sensoriais típicas do chocolate

Após sua remoção do fruto, as sementes passam por um processo espontâneo de fermentação que pode durar de 3 a 10 dias (Camu *et al.*, 2007). O interior dos frutos é considerado estéril e a inoculação de microrganismos é feita através das mãos dos manipuladores, das ferramentas de trabalho, das caixas de transporte, da superfície dos frutos, entre outros (Nielsen *et al.*, 2007; Jespersen *et al.*, 2005). O processo fermentativo consiste de uma sucessão microbiológica da qual fazem parte leveduras, bactérias ácido-lácticas e bactérias ácido-acéticas.

Num primeiro momento, durante a fermentação, as leveduras são favorecidas pelo pH baixo, alta concentração de açúcar e pouca disponibilidade de oxigênio. Elas produzem etanol a partir da fermentação de açúcares e ácido cítrico, e degradam pectina. A atividade das leveduras aumenta o pH, e eleva a temperatura, dando condições para que a população bacteriana cresça. As bactérias lácticas consomem açúcares e ácidos orgânicos o que eleva o

pH e a aeração. As bactérias acéticas dão início ao seu crescimento oxidando o etanol, inicialmente produzido pelas leveduras, a ácido acético. O calor gerado por esse processo exotérmico, junto com a difusão para dentro da amêndoa, do etanol e ácido acético, mata o embrião e põe fim à fermentação (Schwan *et al.*, 2004). Esse processo dá origem a precursores do *flavor*, que será aprimorado nas etapas seguintes do processo de fabricação do chocolate.

A despeito da importância da fermentação na formação do sabor do chocolate, pouco se sabe sobre a função das bactérias ácido-lácticas nesse processo. Autores diversos têm acessado sua diversidade nos principais centros de produção de cacau, lançando mão de técnicas tradicionais de cultivo de microrganismos e as chamadas técnicas independentes de cultivo (Ardhana *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007).

Em quase todas as investigações, os lactobacilos prevalecem no grupo de BAL. Ardhana (2003) encontrou principalmente *L. cellobiosus* e *L. plantarum* em estudo conduzido na Indonésia, no entanto usou apenas métodos tradicionais de cultivo, que apresentam limitações. Nielsen *et al.* (2007) identificou *L. fermentum* como espécie de bactéria láctica predominante na fermentação em Gana. *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, *Pediococcus acidilactici* também foram observados nesse estudo. Usando a técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) foi possível constatar que a dinâmica microbiana se modificava conforme o tipo de fermentação era alterado. Na República Dominicana, usando apenas técnicas bioquímicas, Gálvez *et al.* (2007) isolou *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* e *Lactobacillus brevis*. Em Gana (2007), Camu *et al.* isolou principalmente *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, e *Enterococcus casseliflavus*. No Brasil, Bahia, Passos *et al.* (1984) usando técnicas tradicionais de cultivo

identificou na fermentação do cacau *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, entre outros.

Ainda que pouco se saiba a respeito da função das bactérias lácticas na fermentação do cacau, a sua ubiquidade nesse processo, torna-o uma fonte promissora para a prospecção de linhagens para aplicação biotecnológica.

4. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Doenças inflamatórias intestinais (DII) correspondem a um conjunto de apresentações clínicas caracterizadas por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal. Doença de Crohn e Colite Ulcerativa são as principais formas de DII, as quais compartilham algumas características clínicas e patológicas, mas podem ter diversos aspectos divergentes (Guarner *et al.*, 2002). A primeira pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, mas principalmente o íleo terminal, o ceco, a região perianal e o cólon. Áreas de mucosa normal são intercaladas por porções inflamadas. Observa-se o envolvimento de toda espessura da parede intestinal e uma densa infiltração de linfócitos e macrófagos. O paciente apresenta dor, diarreia, perda de peso e apetite, além de complicações como formação de abscesso e obstrução do lúmen do intestino. O processo inflamatório da colite ulcerativa está restrito às áreas do reto e cólon. Afeta áreas superficiais da mucosa, e apresenta extensa infiltração de linfócitos e granulócitos e perda de células globosas. Indivíduos afetados exibem perda de sangue, diarreia e perda progressiva da função peristáltica. (Bouman *et al.*, 2003). A etiologia dessas doenças não está completamente esclarecida, mas já é conhecido que envolve uma interação de fatores ambientais, genéticos e relacionados ao sistema imune.

A elevação na incidência de DII tem sido associada com o progresso econômico e social. A principal teoria, a “hipótese da higiene”, propõe que a diminuição da exposição aos

microrganismos, ocasionado por um estilo de vida mais limpo, onde a comida e água são seguros, e a utilização de antibióticos é disseminada, diminuindo a ocorrência de infecções, tudo isso resultaria no desenvolvimento de um sistema imune despreparado, que muitas vezes é incapaz de eliminar um microrganismo patogênico ou pode provocar uma resposta exacerbada a bactérias da própria microbiota. Uma grande variedade de outros fatores ambientais está associado ao desenvolvimento de DII, como o fumo, fatores dietéticos, contraceptivos orais e drogas antiinflamatórias, desequilíbrio da microbiota comensal, apendectomia entre outros (Danese *et al.*, 2004).

O primeiro gene associado com o risco de desenvolvimento de doença de Crohn foi o NOD2/CARD15, envolvido na sinalização mediada pelo receptor TLR-2 (Danese *et al.*, 2006). Desde então diversos genes relacionados com a reatividade imune e a resposta inata a bactérias tem sido relacionados ao desenvolvimento de Doença de Crohn e Colite Ulcerativa, sugerindo que mutações específicas têm um impacto direto sobre a forma como cada indivíduo vai reagir a um desafio imune, predispondo-o a condições clínicas como DII (Scaldaferri *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos têm tentado estabelecer uma ligação entre o desenvolvimento de DII e determinados patógenos ou membros da microbiota comensal. *Mycobacterium paratuberculosis* tem sido achado no intestino de pacientes com doença de Crohn (DC) (Pierce *et al.*, 2009), no entanto essa associação ainda é controversa já que drogas antituberculínicas não mostram qualquer efeito sobre a inflamação intestinal (Danese *et al.*, 2006). Outro patógeno associado com DIIs é a *E. Coli* aderente-invasiva, que coloniza a mucosa ileal de pacientes com DC e tem a capacidade de aderir para invadir as células epiteliais. Se esse patógeno causa a doença ou apenas invade a mucosa já inflamada, ainda não está completamente esclarecido (Carvalho *et al.*, 2009). O papel etiológico de outros conhecidos patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis* e

Cytomegalovirus têm sido proposto. Um considerável corpo de dados reforça a participação de microrganismos comensais no desenvolvimento da inflamação intestinal crônica. Animais suscetíveis criados em condições livre de microrganismos não desenvolvem colite, ao passo que o ambiente normal leva ao surgimento do processo inflamatório, supostamente porque a resposta imune a esses microrganismo é a base da patogênese da doença. Existe uma tentativa de associar determinados grupos microbianos ao desenvolvimento de DII. *Clostridium* e *Bacteroides* são encontrados numa densidade maior no intestino de pacientes com Doença de Cronh e Colite Ulcerativa, ao passo que *Lactobacillus* e *Bifdobacterium* destacam-se no trato gastrintestinal de indivíduos saudáveis. Além disso, em modelos experimentais, esses gêneros não induzem a inflamação em animais suscetíveis, mas podem revertê-la (Madsen *et al.*, 1999, Danese *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2007).

Na investigação da etiologia e patogênese das doenças inflamatórias intestinais o fator imunológico tem avançado significativamente, mostrando que defeitos na imunidade inata, assim como irregularidades na resposta adaptativa estão envolvidos no processo. Algumas adaptações da resposta imune inata garantem a homeostase da mucosa intestinal, tais como compartimentalização e expressão diminuída de receptores. Defeitos genéticos relacionados à ação de células apresentadoras de antígeno, macrófagos e células NK são apontados como um dos mecanismos de desenvolvimento dessas patologias. Com relação à imunidade adaptativa, os estudos concentram-se no estudo dos linfócitos T regulatórios, que são células capazes de controlar a resposta imune, através da liberação de citocinas regulatórias como IL-10, a qual modula a ação de macrófagos, células dendríticas e outros linfócitos T. Na DII eles podem estar diminuídos, mas não é incomum encontrá-los em número normal na mucosa afetada, mostrando que podem estar não funcionais. Tem sido estabelecido que a Doença de Cronh é dominada por uma resposta Th-1, enquanto a Colite Ulcerativa é mediada pelo perfil Th-2. Evidências experimentais mostram que macrófagos de pacientes com Doença de Crohn e

modelos experimentais que mimetizam essa condição produzem quantidades maiores de IL-12 e IFN- γ que pacientes normais. No caso da Colite Ulcerativa, quantidades menores são produzidas. A produção de autoanticorpos associada à elevação de citocinas como IL-5 e IL-13 caracterizam o perfil Th-2 da colite ulcerativa. Adicionalmente, células Th-17, um grupo desenvolvimental e funcionalmente distinto de linfócitos T, caracterizados pela produção de IL-17, estão envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias intestinais e vem sendo identificadas na mucosa inflamada de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa (Strober *et al.*, 2002; Bouma *et al.*, 2003; Coombes *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de modelos de DII é usada no estudo dos mecanismos de patogênese, mecanismo de ação ou averiguação do potencial probiótico de determinadas linhagens microbianas. Nesses modelos a colite pode se desenvolver espontaneamente como resultado de um defeito genético natural ou induzido; pela exposição a um agente indutor da inflamação; ou pela transferência de populações de células T não regulatórias para um hospedeiro severamente linfopênico, que falha no desenvolvimento de células Treg. A administração intra-retal de ácido acético resulta numa perda da barreira epitelial e desenvolvimento de uma colite difusa, caracterizada por um infiltrado inflamatório transmural, reproduzindo os estágios iniciais do processo inflamatório em DII (Fabia *et al.*, 1993; Strober *et al.*, 2002; Rivera-nieves *et al.*, 2008).

O corrente conhecimento de que a microbiota influencia a fisiologia intestinal e a patogênese das doenças inflamatórias intestinais tem levado os cientistas a investigar a utilidade de probióticos no tratamento dessas patologias. Em modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro* linhagens de *Lactobacillus* mostram-se capazes de influenciar a regulação de genes envolvidos na geração do processo inflamatório, reduzindo o dano tecidual. *Lactobacillus rhamnosus* preveniu a recorrência da colite em ratos HLA-B27 (Dieleman *et al.*, 2003), induziu irreponsividade de células T periféricas através da modulação das células dendríticas

(Braat *et al.*, 2004), bloqueou o processo inflamatório em um cultivo de epitélio através da produção de espécies reativas de oxigênio que inibiram a ação do NF- κ B (Lin *et al.*, 2009), atenuou a colite induzida por TNBS (Shibolet *et al.*, 2002) e melhorou a função de barreira por inibir a apoptose de células epiteliais intestinais (Gotteland *et al.*, 2001); *L. reuteri* inibiu a síntese de IL-8 pelas linhagens intestinais T84 e HT29, prevenindo a translocação de NF- κ B (Ma *et al.*, 2004), também preveniu a colite num modelo animal knock-out para IL-10 (Madsen *et al.*, 1999); *L. casei* e *L. bulgaricus* reduziram a expressão de TNF- α na mucosa de pacientes com Doença de Crohn, *ex vivo* (Barruel *et al.*, 2002); outras diversas linhagens se mostraram capazes de atenuar a colite causada por dextran sulfato de sódio (dss) e pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico (TNBS) (Osman *et al.*, 2004; Castagliuolo *et al.*, 2005; Peran *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2006). Apesar dos resultados promissores obtidos em modelos experimentais, poucos estudos registram efetividade de *Lactobacillus* em triagens clínicas (Prantera *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2004; Marteau *et al.*, 2006; Zocco *et al.*, 2006). Além dos lactobacilos, outros probióticos vem sendo sondados quanto à capacidade de tratar ou prevenir a colite. Linhagens de *Bifidobacterium* atenuam a colite em modelos animais e inibem o crescimento de *Bacteroides vulgatus*; *Escherichia coli* Nissle 1917 regula a inflamação via TLR4 e TLR-2, restaura a barreira epitelial e inibe a expansão de células T recrutadas para a mucosa; *Sacharomyces boulardii* bloqueia a ação de NF- κ B e inibe a expressão de IL-8; *Clostridium butyricum* produz altos níveis de ácidos graxos que restauram a barreira epitelial (Damaskos, 2008).

O papel central da microbiota no desenvolvimento de DII está estabelecido, bem como a utilidade de probióticos como alternativa no tratamento e prevenção dessas patologias. No entanto, ainda existe grande necessidade de triagens clínicas em que aspectos como dosagem e duração da administração sejam ensaiadas, para que o efeito terapêutico desses microrganismos seja melhor aproveitado. Outrossim, o uso de modelos não isogênicos na

avaliação do potencial probiótico de microrganismos para tratamento de DII é importante para reproduzir condições mais próximas da realidade.

JUSTIFICATIVA

A grande procura pelos alimentos funcionais tem aumentado o interesse científico e econômico no desenvolvimento de produtos probióticos. Apesar do elevado número de produtos disponíveis com essa propriedade, a busca por novas linhagens microbianas para essa aplicação se fundamenta no fato de que seus efeitos são linhagem/espécie/gênero dependentes. Historicamente, os microrganismos usados como probióticos são oriundos da microbiota humana, mas novos isolados de fontes extraintestinais, principalmente produtos fermentados, tem demonstrado esse potencial. O cacau, o mais importante produto agrícola do sul da Bahia, é uma fonte conhecida de bactérias lácticas, principal grupo microbiano usado em preparações probióticas. A necessidade de novas linhagens com efeitos mais específicos, aliado à falta de estudos sobre aplicações biotecnológicas dos microrganismos dessa fonte, torna relevante a prospecção de bactérias lácticas, que tenham efeitos sobre a saúde, visando o desenvolvimento de um produto com propriedades funcionais.

Potential probiotic of lactic acid bacteria from
cocoa (*Theobroma cacao*) fermentation in colitis model

Thalis Ferreira dos Santos¹; Denise Sande Santos¹; Marcus Vinicius Alves Lima¹; Rachel Passos Rezende¹; João Carlos Teixeira Dias¹; Carla Cristina Romano^{1*}.

thalis.ferreira@gmail.com; marcus_biomed@hotmail.com; sande_ba@yahoo.com.br;
rachel@uesc.br; jctdias@uesc.br; romanocc@uol.com.br.

¹Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, BRAZIL.

* *Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dra. Carla Cristina Romano

Department of Biological Sciences

UESC – State University of Santa Cruz

Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16

Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: 011 55 73 3680 5105

e-mail: romanocc@uol.com.br

ABSTRACT

Aims: To investigate the potential probiotic of cocoa lactic acid bacteria in a model of experimental colitis.

Methods and Results: eighty lactic acid bacteria isolated from cocoa fermentation were grouped into eight pools and used as starter organisms for preparation of fermented lactic solutions containing 10^9 CFU ml⁻¹. Additionally, another milk solution containing a single strain was used. The effect of lactic acid bacteria was tested in rats with colitis induced by acetic acid. Serum concentrations of cytokines, IgA, total and differential counts of blood leukocytes, and histological appearance were compared with the control colitis without treatment. LAB pools reduced the total and differential number of white blood cells. Concentrations of IFN- γ were also downregulated in animals treated with the pools. Some groups have shown an increase in serum IL-10 and IgA. There was no difference in serum TNF- α . Histological analysis showed that cocoa lactic acid bacteria were able to reduce the inflammatory infiltrate and restore the tissue architecture. The group treated with a single strain was similar to the untreated control.

Conclusions: Results confirm the potential probiotic of cocoa lactic acid bacteria multistrain milk solutions in treatment of experimental colitis. The use of a single strain showed no effect in reducing inflammation.

Significance and Impact of the Study: The cocoa fermentation is a source of lactic acid bacteria that can be used as probiotics. Studies using isogenic models and humans will clarify the mechanisms of immune response modulation in inflammatory bowel disease.

INTRODUCTION

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host (FAO/WHO, 2002). They are able to prevent or decrease the time of diarrhea, reduce the tissue damage caused by inflammatory bowel disease, reduce cholesterol levels, and effects on certain clinical conditions such as asthma, cancer and extra-intestinal infections (Isolauri *et al.* 1991; Arvola *et al.* 1999; Dieleman *et al.* 2003; Lenoir-Wijnkoop *et al.* 2007). Probiotics need to survive gastrointestinal conditions to colonize the intestine, where they represent a barrier to the development of pathogens by competing for adhesion to mucus and epithelial cells and produce antimicrobial compounds such as bacteriocins and hydrogen peroxide. They also modulate the immune effect by interacting with cellular receptors, enhancing response to pathogens or reducing chronic inflammatory responses (Oelschlaeger, 2009).

The pathogenesis of inflammatory bowel disease, including ulcerative colitis and Crohn's disease, are not yet elucidated and are considered to be multifactorial (O'neil, 2003). A growing body of data indicates that the excessive amount of cytokines, nitric oxide and cytokines have a role in mediating the intestinal injury by promoting the disruption of epithelial integrity (Grisham 1990).

Evidence suggests that probiotics, mainly lactic acid bacteria (LAB), represent promising candidates for the prevention and control of IBD. Data from animal models of colitis have indicated that certain strains or combinations of strains can prevent and treat intestinal inflammation, because they promote the modulation of this process, reducing histological damage (Scaldaferri and Fiocchi, 2007; Sheil *et al.* 2007; Reiff and Kelly, 2009).

The growing interest in the development of functional foods has increased the search for new strains with probiotic applications. Thus, various fermented products have served as a source of lactic acid bacteria in the development of products that have some effect on health (Todorov *et al.* 2008; Vuyst *et al.* 2008, Hong *et al.* 2009). Fermentation of cocoa beans (*Theobroma cacao*), the main raw material in the manufacture of chocolate, is a known source of these microorganisms. In this important process for the development of the end product sensorial characteristics, several species of *Lactobacillus* have been identified, namely, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, among others (Schuwan and Wheals, 2004).

This study aimed to access the probiotic potential of lactic acid bacteria from cocoa fermentation, testing their resistance to gastric pH *in vitro* and its ability to reverse the inflammatory process in an experimental colitis models.

MATERIALS AND METHODS

Study design - Eighty strains of lactic acid bacteria isolated from the cocoa fermentation process were randomly grouped into eight pools. Each of these groups was used to ferment a milk solution. Additionally, one strain isolated from the same origin was used in the fermentation of another milk solution used in the study.. Fifty-five rats were divided into nine experimental groups and two control groups of five animals each: G1-G9 groups, that received solutions containing mix of strains or just one strain (G9) of lactic acid bacteria; C1, control group subjected to the colitis process, but was not treated with the potential probiotics; C2, control group that did not suffer colitis or received treatment. G1-G9 and C1 suffered intra-rectal instillation of acetic acid to induce colitis. Treatment was initiated twenty-four

hours after induction of the inflammatory process. Each experimental group received 2 ml day of one of multistrain milk solutions or a single lineage, for seven days. Each group was treated with only one fermented solution during the experiment. On the eighth day, the animals were sacrificed for blood collection and macroscopic and microscopic colon analysis.

Microorganisms isolation - for isolation of lactic acid bacteria, 100g of cocoa beans were collected from a fermentation box every twelve hours for five days. They were suspended in saline (NaCl 0, 85%) and processed in a blender pulping (Arno, model BA/BSA, RC series, 300 W). Next, the pulp was serially diluted and applied on the MRS agar (HiMedia). After growth at 37 ° C, under anaerobic conditions (5% CO₂) for 24 hours, the isolates were tested for catalase activity and those who were catalase negative were submitted to Gram stain. The gram-positive and catalase negative rods were reisolated and maintained in MRS broth (HiMedia) with 25% glycerol at -20°C for later experiments.

Preparation of fermented solutions - 80 randomly selected isolates were grown in MRS broth for 24 hours at 37 ° C. The cells were collected by centrifugation at 7000g for 10 minutes (20°C), washed and diluted in saline (NaCl 0.85%) to A_{600nm}= 0.3. Milk solutions were prepared by dissolving milk powder in water (1:10). They were then heated to 85 ° C for 5 minutes and immediately cooled in ice bath to 42 ° C. Eight solutions were inoculated with 1mL (A_{600nm}= 0.3) of strains that comprising each pool. In another solution only one strain was inoculated. Solutions containing the inoculum were left to ferment at 42°C until it reached the pH of 4.5, which was followed by the breakdown of the clot by shaking and cooling to 20°C with an ice bath. Lactic acid bacteria concentration was analyzed by serial dilutions, plating on MRS agar and counting. When necessary, it was adjusted to 10⁹CFUml⁻¹. The solutions were kept refrigerated between 2 and 8°C.

Animals – Males Wistar rats (*Rattus norvegicus*), between 8 and 12 weeks, (weight 200 to 250g) were used in experimental colitis. The animals had free access to food and

water, were accommodated in a room with controlled temperature and light. After experiments, animals were killed with halothane overdose and samples of blood and proximal colon were collected to investigate inflammation. The Local Animal Care and Use Committee approved all experimental protocols described in this study.

Colitis Induction – Briefly, the rats were anaesthetized with halothane and given 1mL of 10% acetic acid by means of a cannula inserted 5 cm through the anus.

Leukocytes blood count – The blood samples were diluted in Turk solution (1:20) and counted in light microscope. For differential counting, 100 cells were counted (400 x).

Macroscopic and Microscopic Damage- Immediately after death, the colon was removed and rinsed with saline. Intestinal damage was studied with macroscopic lesions, the presence of liquid feces and edema. To assess microscopic damage, a segment of proximal colon was resected and fixed in 10% formalin. After dehydration in an ascending series of alcohol and xylene, were embedded in paraffin. Seven-micrometer sections were stained with hematoxylin-eosin and examined by light microscope at 100X and 400X.

Analysis of cytokines and IgA - serum concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IgA were measured using ELISA. The experimental procedures were conducted according the manufacturer's instructions (eBioscience Rat IFN γ ELISA, Rat TNF α ELISA eBioscience, RayBio IL-10 ELISA Kit, RAT IgA ELISA ICL).

Survival to gastric conditions - bacterial strains survival was tested in a stomach conditions simulation. The fermented solutions containing 10^9 CFU mL⁻¹ was serially diluted, incubated in a solution of 0.85% NaCl, pH 2.0 plus pepsin 3mg ml⁻¹ at 37 ° C, and applied on agar MRS. Viability was examined at 0, 15min, 30min and 2h.

Statistical analysis - The difference between the experimental groups and controls was tested by ANOVA using the GraphPad Prism 3.0. All tests were performed in duplicate and the results represent the average of two experiments.

RESULTS

LAB treatment decreased leukocyte blood counts

Treatment with LAB pools at a dose of 10^9 CFU ml⁻¹ decreased global and differential leukocytes blood count. A tendency to a decrease, without reaching statistical significance was observed in all LAB pools in comparison to C1 (**Fig. 1**). Only G1, G2 and G7 obtained a significant decrease, corresponding to a reduction of 63%, 48% and 50%, respectively. The count of G1 was also significantly lower than C2 group (**Fig. 1**). In the differential count (**Fig. 2**), G1 and G2 showing a significant decrease of neutrophils and monocytes. Only G1 showed lymphocyte count greater than the control C1, increased 40%. There was no difference in eosinophil count in any of the experimental groups. G9 group, which received the single strain milk solution, exhibited a high count of neutrophils and monocytes, and a decreased percentage of lymphocytes.

Effect of LAB pools administration on cytokine and IgA production

All experimental groups that received LAB pools, except for groups G4 and G9, showed a decrease in serum IFN- γ (**Fig. 3A**), but only the G2 showed significant differences compared to C1. Importantly, the G9 group showed an increase of 67% this cytokine. Regarding the IL-10 production of, we observed a significant increase of this cytokine in G2 (47%) compared with group C2 (**Fig. 3B**). In G7 and G8 groups the increase of IL-10 production was 41% and 49% respectively. The groups G3 and G6 showed a discrete increase this cytokine (**Fig.3B**).

On the other side, the detection of TNF- α was similar in all experimentals groups. Only G4 group showed an increase of 70% compared to C1 (data not shown). Interestingly,

this same group also showed an elevated IFN- γ production in relation to other experimental groups.

Finally, for IgA, we observed increased production this antibody in G1, G2 and G3 LAB pools in relation of C1 (**Fig. 3C**). However, only G2 was significantly different. The G9 group exhibited similar IgA concentration to the control C1.

Effects of LAB pools treatment on colonic inflammation in rats

Macroscopically, the colon of control C1 showed edema, hyperemia and accumulation of feces. Besides, the groups that received pools of lactic acid bacteria exhibited reduction of these characteristics. Groups G1, G2, G7 and G8 have the best results, showing similarity to the control C2, without colitis. The G9 group showed macroscopic signs of inflammation, similar to control C1. All animals treated with lactic solutions showed accumulation of intestinal gas.

The histological analysis revealed that LAB treatment was efficient in promoting the recovery of colonic tissue. The group with colitis without treatment showed a colon with a dense inflammatory infiltrate, with areas of necrosis, edema and loss of tissue architecture (**Fig. 4A**) when compared with negative control (**Fig 4B**).

The experimental groups showed varying degrees of inflammation (**Fig 4C, 4D**). But G1 group (**Fig 4C**) presented pronounced recovery, with reduction of leukocyte infiltration, hypertrophy of glandular cells and recovery of tissue structure. The G9 group not display signs of reduction of inflammation, corroborate cytokine and IgA results (**Fig 4E**).

The cocoa LAB resistance to gastric conditions

The survival to simulated gastric juice varied between 0 and 93% after an exposure of 15 minutes, compared to time 0. At that time, pools 1, 3 and 9 had the lowest survival rates, especially the pool 3 with no viable microorganism. Solutions 2, 4, 5 and 6 showed median survival of 46%. In preparations 7 and 8 was observed viability of 75 and 93% respectively.

After 30 minutes of exposure was not possible to detect viable cells in pools 1 and 2. The other groups had survival between 3 and 14%. Only in the fermented solutions 5, 7 and 9 could detect viable cells after 2h incubation. Even though the survival rate compared to the initial time was low (0.3%, 0.2% and 3% respectively), the number of microorganisms is still remarkable for the probiotic effect, the order of 10^7 and 10^8 CFU mL⁻¹ (**Table 1**).

DISCUSSION

This is the first report of the evaluation of the probiotic potential of various cocoa LAB pools. Lactic acid bacteria are found dispersed in the environment, and are commonly isolated from dairy products, meats, cereals, among others (Chen *et al.* 2005; Zamudio-Maya *et al.* 2006; Cenci-Goga *et al.* 2008; Najjari *et al.* 2008). In the cocoa fermentation several types have been identified as *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella* and especially *Lactobacillus* (Schwan and Wheals, 2004; Camu *et al.* 2007). Walter *et al.* (2001) demonstrated the specificity of lac1/lac2 primes to amplification of a fragment of the 16S rDNA of *Lactobacillus*. Using this primer set, the strains of gram positive and catalase negative rods used in this study were previously identified as *Lactobacillus* (data not shown). These data will be used in another publication.

Organisms used as probiotics in general are from human origin. However, recent studies have sought to investigate the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated mainly of fermented products. The microorganisms from extra-intestinal sources have shown interesting properties, such as bacteriocin production, adherence to epithelial cells and mucus, and resistance to gastric pH and bile (Jacobsen *et al.* 1999; Todorov *et al.* 2008; Zoumpopoulou *et al.* 2008; Klayraung and Okonogi, 2009; Sung-Mee and Im 2009;). The

results of our study indicate that LAB pools 1, 2 , 3 and 7 had therapeutic effects on experimental colitis, even in varying degrees.

Animal models of IBD have been useful in the investigation of new therapies. Colitis induced by acetic acid results in epithelial barrier dysfunction, loss of crypt architecture, dense inflammatory infiltrate, reproducing early stages of Crohn's disease and ulcerative colitis (Bouma and Strober, 2003; Rivera-Nieves *et al.* 2008). Although we found anti-inflammatory effects of LAB pools in our rat acetic acid colitis model, Steidler *et al* found no effect on dextran sodium sulfate- induced inflammation in mice or spontaneous colitis developed in IL-10 deficient mice using treatment with *Lactobacillus lactis*. On the contrary, a protective effect of *L. plantarum* has been described in the spontaneous colitis developed by IL-10 deficient mice. The difference between these observations is likely to be attributed to the use of different animal models and experimental settings. But we believe that the use of non isogenic experimental models is very important to provide data on the existence or not of probiotic properties.

The process of intestinal inflammation is associated with increased numbers of peripheral macrophages and polymorphonuclear leucocytes, which show an activated profile and increased survival, and are the main source of inflammatory cytokines (McCarthy *et al.* 1991; Nikolaus *et al.* 1998; Tanaka *et al.* 2008). Farooq *et al.* (2009) showed that the blockade of chemokine receptor CXCR2 in neutrophils, in mice subjected to colitis induced by dextran sodium sulfate, significantly reduced the number of neutrophils in the mucosa as compared to control, resulting in the reduction of harmful effects on the tissue and emphasizing the participation of these cells in the intestinal inflammation pathogenesis. Treatment with cocoa lactic acid bacteria reduced the total number of circulating leukocytes and the percentage of neutrophils and monocytes, particularly in G1 and G2. Importantly, the group treated with the preparation containing only one strain (G9) did not exhibit reduced

total and differential leukocyte count. The inhibition of neutrophil may explain for their intestinal anti-inflammatory effect, given the important role attributed to these cells in the inflammatory process. The histological characteristics reinforced the leukocyte count, since the inflammatory infiltrate colonic observed in our study was low in LAB treatment groups.

Just like, the cytokines produced by circulating and infiltrate leucocytes are responsible for the exacerbation and perpetuation of the inflammatory process in IBD. In Crohn's disease, inflammation is mediated by Th1 cells, which are induced by IL-12, leading to increased expression of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8, among others (Waldner and Neurath, 2009). Conversely, IL-10 acts by modulating the inflammatory response, to restore tolerance to luminal antigens (Lammers *et al.* 2003). In our study, LAB pools treatment showed different effects on serum cytokines. The G2 LAB treatment was able to down regulate the IFN- γ production, while inducing the anti-inflammatory cytokine IL-10. Also, with the exception of G4 and G9, all groups exhibited a tendency to decrease. Similarly, the G7 and G8 LAB treatments were able to increase the IL-10 production, also demonstrating an anti-inflammatory potential. When other pro-inflammatory cytokine was evaluated, TNF- α , its serum levels were similar in all groups. This fact can be explained by the time of blood collection that occurred after 7 days of treatment. The TNF- α is produced in the early stages of inflammation and quickly consumed in serum. Moreover, many studies that evaluate this cytokine make its detection in mucosa (Pavan *et al.* 2003; Peran *et al.* 2007). Similarly our, Zoumpoulou *et al.* 2008 using the strain *L. fermentum* ACA-DC 179 observed high levels of TNF- α and IL-10, with an rate IL-10/IL-12 significantly higher, suggesting the anti-inflammatory profile this lineage. Another interesting fact observed in our study was that the anti-inflammatory effect in treatment LAB pools was not observed with isolated bacteria. O G9 LAB showed exacerbated inflammatory process, high levels of IFN- γ and leukocytes. The knowledge that the effects of these microorganisms

are strain/species/gender dependent, could suggest that preparations containing more than one strain be more effective, because they would have a synergistic effect. In addition, most probiotic products currently marketed are multilignage and not singlestrain. Timmerman *et al.* (2004), comparing the functionality of probiotics multilignage, highlighted the superiority of these products in growth and reduced mortality of chickens, the recovery of the intestinal microbial balance after antibiotic use, and treatment of infections caused by *Salmonella spp* and *Escherichia coli* O157: H7. On the other hand, IgA is the main isotype immunoglobulin secreted in mucosal surfaces and play a central role in local immunity by creating a barrier against pathogens (Suzuki *et al.* 2007; Zanini *et al.* 2007). The activity of IgA may limit the contact of the normal microbiota with the epithelium, reducing the chances of activating a destructive inflammatory response (Coombes and Maloy 2007). The increased serum and secretory levels of IgA are elevated after treatment with probiotics. This phenomenon was observed in this study mainly in G1 and G2 LAB pools. These groups also showed the best results in histological analysis and levels of IFN- γ and IL-10. It is likely that the action of IgA in the restoration of epithelial barrier damaged by acetic acid, preventing the invasion of luminal bacteria, is involved in the probiotic effect of lactic acid bacteria used in this study.

The need of the human origin of probiotics assumes that bacterial species that are part of the indigenous microbiota might be more likely to survive in gastrointestinal tract. To access the resistance of strains candidates, *in vitro* tests of gastric juice are used, which have limitations and are not always good indicators of potential probiotic. Sometimes, organisms with low resistance show promising results in tests *in vivo* (Mishra and Prasad, 2005). Cocoa lactic bacteria showed limited resistance to simulated gastric environment. After 30 minutes of exposure, most of strains lost viability. Although they are well adapted to acidic conditions of fermented foods, lactic acid bacteria from extra-intestinal origin are usually susceptible to a pH lower than 3.0 (Jacobsen *et al.* 1999; Todorov *et al.* 2008; Zoumpopoulou *et al.* 2008).

Factors such as the food matrix, mucin and pepsin can have protection for probiotics during passage through the stomach (Charteris *et al.* 1998; Vinderola *et al.* 2000; Mishra and Prasad, 2005). Importantly, the effect of non-viable bacteria on the immune system has been established (Cai *et al.* 2010). Due to the limitations, survival in gastrointestinal conditions trials may not represent the behavior of the bacterial strain in the human body, but are useful in the selection of potentially probiotic microorganisms.

In conclusion, cocoa LAB pools can exert beneficial anti-inflammatory properties in IBD. However, more detailed study (eg with isogenic model) and the identification of LAB species is essential for reinforce these findings. In addition, future human clinical studies will be required in order to confirm these results.

REFERENCES

1. Arvola T; Laiho K; Torkkeli S; Mykkänen H; Salminen S; Maunula L; Isolauri E. (1999) Prophylactic Lactobacillus GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* **104** (5):e64.
2. Bouma, G., Strober, W. (2003) The immunological and genetics basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* **3**, 521-533.
3. Cai, S., Bay, B. H., Lee, Y. K., Lu, J., Mahendran, R. (2010) Live and lyophilized Lactobacillus species elicit differential immunomodulatory effects on immune cells. *FEMS Microbiol Lett.* **302**, 189-196.
4. Camu, N., Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., Vuyst L. (2007) Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic

- Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 1809-1824.
5. Cenci-Goga, B. T., Ranucci, D. Miraglia, D., Cioffi, A. (2008) Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage. *Meat Sci.* **78**, 381-390
 6. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract *J Appl Microbiol*, **84**, 759–768.
 7. Chen, Y., Yanagida, F. and Shinohara, T. (2005) Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett App Microbiol* **40**, 195–200.
 8. Coombes, J. L., Maloy, K. J. (2007) Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* **19**, 116-126.
 9. Dieleman, L. A., Goerres, M. S., Arends, A., Sprengers, D., Torrice, C., Hoentjen, F., Grenther, W. B., Sartor, R. B. (2003) *Lactobacillus* GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut.* **52**, 370–376.
 10. Drouault-Holowacz, S., Foligne, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., Pot, B. (2006) Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: In vitro and in vivo considerations. *Clin Nutr* **25**, 994–1003.
 11. Farooq, S. M., Stillie, R., Svensson, M., Svanborg, C., Strieter, R. M., Stadnyk, A. W. (2009) Therapeutic Effect of Blocking CXCR2 on Neutrophil Recruitment and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *J Pharm Exp Ther.* **329**, 123–129.

12. Gaudier, E., Michel, C., Segain, J., Cherbut, C., Hoebler, C. (2005) The VSL# 3 Probiotic Mixture Modifies Microflora but Does Not Heal Chronic Dextran-Sodium Sulfate–Induced Colitis or Reinforce the Mucus Barrier in Mice. *J Nutr.* **135**, 2753-2761.
13. Grisham, M.B., Gagilella, T.S., von Ritter, C. et al. (1990) Effects of neutrophil derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. *Inflammation.* **14**, 531-542.
14. Hong, W., Chen, H., Chen, Y., Chen, M. (2009) Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. *Int Dairy J.* **19**, 244-251.
15. Horst, N. L., Marques, R. G., Diestel, C. F., Matzke, B. D., Caetano, C. E. R., Simoes, F. C., Andrade, A. F. B., Lobao, W. I., Vaz, L. C. A., Portela, M. C., Braga, J. U., Melo, P. A. (2009) Effects of Probiotic Supplementation on Markers of Acute Pancreatitis in Rats. *Curr Ther Res.* **70**, 136-148.
16. Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. (1991) A human Lactobacillus strain (Lactobacillus Casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics.* **88**, 90–97.
17. Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærregaard, A., Sandstro, B., Tvede, M., Jakobsen, M. (1999) Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in humans. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 4949–4956.
18. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002

19. Klayraung, S., Okonogi, S. (2009) Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang. *Braz J Microbiol.* **40**,757-766.
20. Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D., Campieri, M. (2003) Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **38**, 165-172.
21. Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M. E., Cabana, M. D., Caglar, E., Corthier, G., Rayes, N., Sherman, P. M., Timmerman, H.M., Vanechoutte, M. Van Loo, J., Wolvers, D. A. W. (2007) Probiotic and Prebiotic Influence Beyond the Intestinal Tract. *Nutr. Rev.* **65**, 469–489.
22. McCarthy, D. A., Rampton, D. S., Liu, Y. C. (1991) Peripheral blood neutrophils in inflammatory bowel disease: morphological evidence of in vivo activation in active disease. *Clin Exp Immunol.* **86**, 489–93.
23. Mishra, V., Prasad, D. N. (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics *International J Int J Food Microbiol* **103**, 109– 115.
24. Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., **Zagorec, M.** (2008) Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int J Food Microbiol.* **121**, 342-351.
25. Nikolaus, S., Bauditz, J., Gionchetti, P. (1998) Increased secretion of proinflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin-10 during intestinal inflammation. *Gut.* **42**, 470–476.
26. Oelschlaeger, T.A. (2009) Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**(1), 57-62.

27. O'Neil, D., Steidler, L. (2003) Cytokines, chemokines and growth factors in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **520**, 252-285.
28. Pavan, S., Desreumaux, P., Mercenier, A. (2003) Use of Mouse Models To Evaluate the Persistence, Safety, and Immune Modulation Capacities of Lactic Acid Bacteria. *Clin Diag Lab Immunol.* **10**, 696–701.
29. Peran, L., Sierra, S., Comalada, M., Lara-Villoslada, F., Bailón, E., Nieto, A., Concha, A., Olivares, M., Zarzuelo, A., Xaus, J., Gálvez, J. (2007) A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr.* **97**, 96–103.
30. Reiff, C., Kelly, D. (2009) Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**(1), 25-33.
31. Rivera-nieves, J., Gorfú, G., Ley, K. (2008) Leukocyte Adhesion Molecules in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 1715-1735.
32. Scaldaferri, F., Fiocchi, C. (2007) Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis.* **8**, 171-178.
33. Schwan, R.F., Wheals, A.E. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **44**, 1-17.
34. Sheil, B., Shanahan, F., O'Mahony, L. (2007) Probiotic effect on inflammatory bowel disease. *J Nutr.* **137**, 819S-824S.
35. Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science.* **289**, 1352-1355.

36. Sung-Mee, L., Im, D. (2009) Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(2), 178–186.
37. Suzuki, K., Ha, S., Tsuji, M., Fagarasan, S. (2007) Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol.* **19**, 127-135.
38. Tanaka, T., Okanobu H., Yoshimi, S., Murakami, E., Kogame, A., Imagawa, H., Numata, Y., Kuga, Y., Moriya, T., Ohya, T., Kajiyama, G. (2008) In patients with ulcerative colitis, adsorptive depletion of granulocytes and monocytes impacts mucosal level of neutrophils and clinically is most effective in steroid naive patients. *Dig Liver Dis.* **40**, 731–736.
39. Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* **96**, 219-33.
40. Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M. B., Holzapfel, W. H., Dicks, L. M. T. (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* **104**, 465-477.
41. Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J. A. (2000) Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese C. *J Dairy Sci* **83**, 1905–1911.
42. Vuyst, L., Falony, G., Leroy, F. (2008) Probiotics in fermented sausages. *Meat Sci.* **80**, 75-78.
43. Waldner, M. J., Neurath, M. F. (2009) Novel cytokine-targeted therapies and intestinal inflammation. *Curr O Pharmacol.* **702**, 702-707.

44. Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., Hammes W. P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 2578-2585.
45. Zamudio-Maya, M., Narvaez-Zapata, J. Rojas-Herrera, R. (2008) Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential selective medium. *Lett App Microbiol.* **46**, 402–407.
46. Zanini, K., Marzotto, M., Castellazzi, A., Borsari, A., Dellaglio, F., Torriani, S. (2007) The effects of fermented milks with simple and complex probiotic mixtures on the intestinal microbiota and immune response of healthy adults and children. *Int Dairy J.* **17**, 1332-1343.
47. Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Granette, C., Pot, B., Tsakalidou, E. (2008) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* **121**, 18-26.

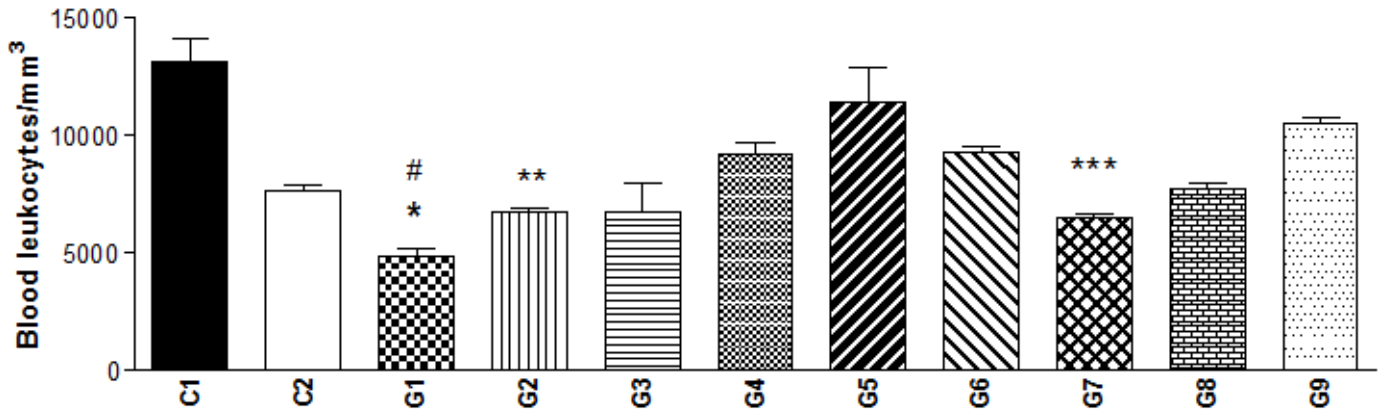
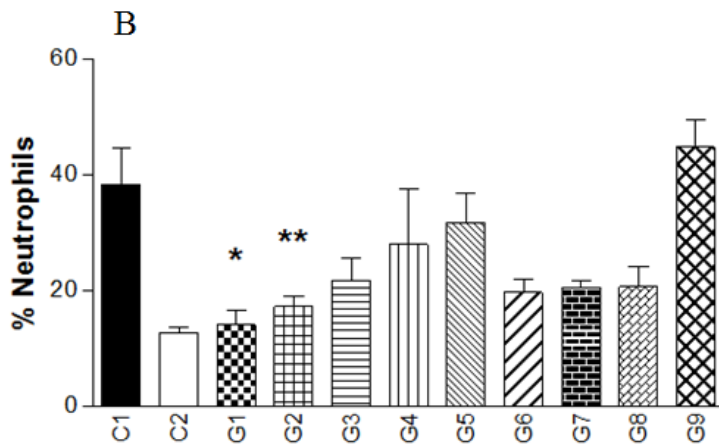
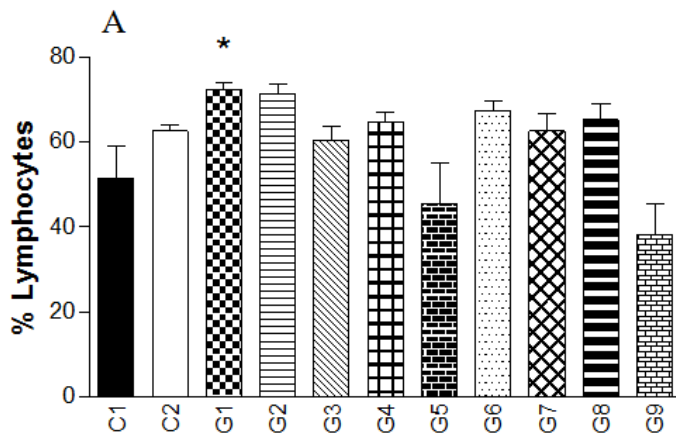


Fig. 1. Effect of the LAB treatment to global leukocytes counts (n=05 for each group). The means and standart errors represented by vertical bars. * P<0,001 significantly differences vs C1 group; # P<0,01 significantly difference vs C2 group; **P<0,05 significantly differences vs C1 group.



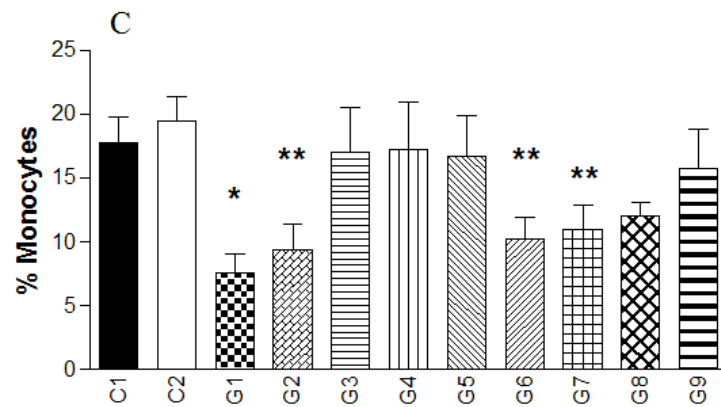


Fig. 2. Effect of a LAB treatment to while blood cells differential count (n=05). The means and standart errors represented by vertical bars. A. Percentage of lymphocytes *P<0,05 significantly differences vs C1 group. B. Percentage of neutrophils. C. Percentage of monocytes *P<0,01 significantly differences vs C1 group; **P<0,05 significantly differences vs C1 group.

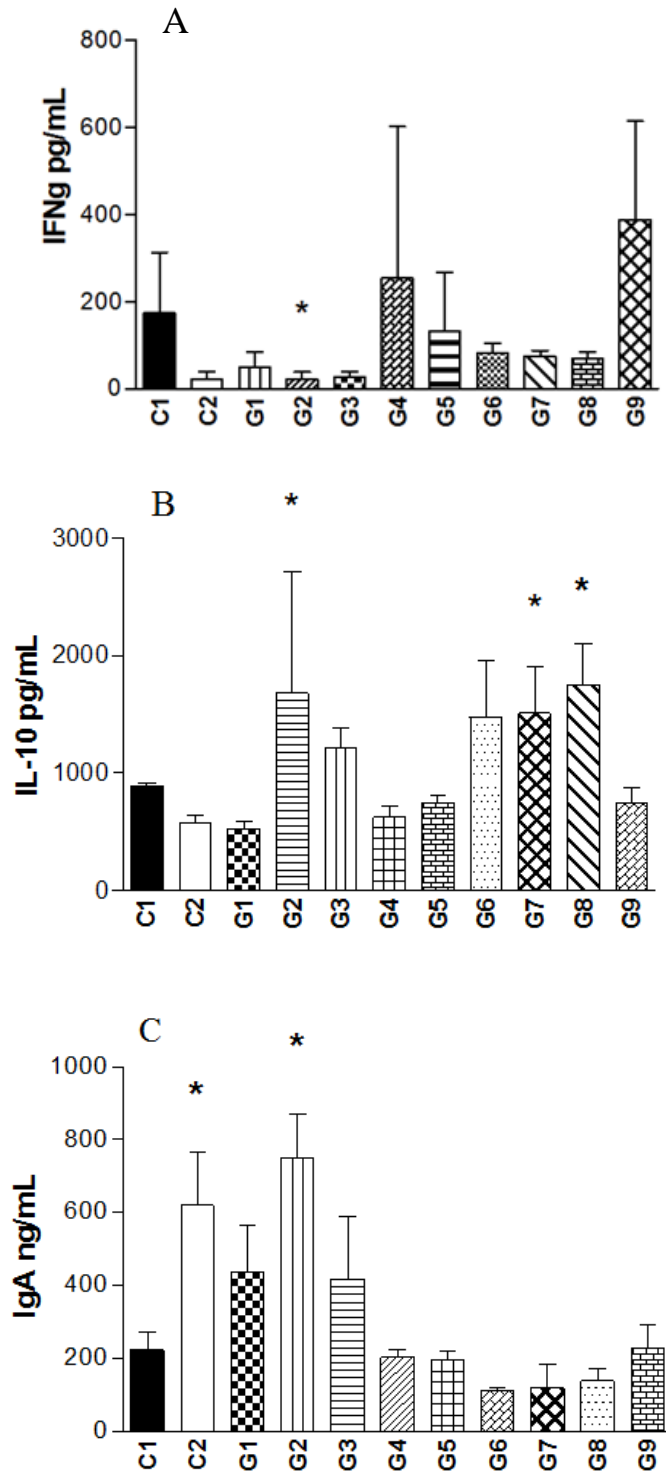
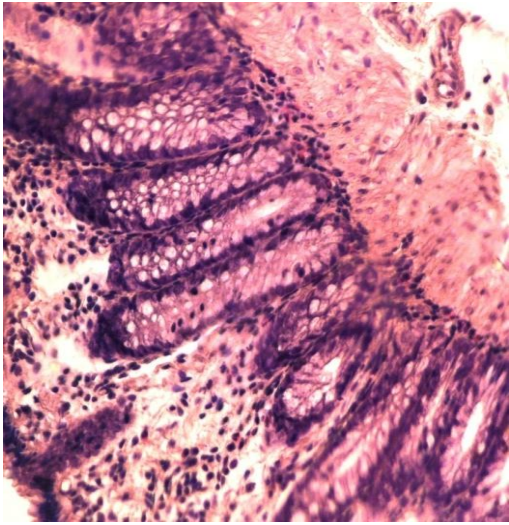


Fig. 3. IgA and cytokines detection in serum (n=05). The means and standart errors represented by vertical bars. A. IFN- γ *P<0,05 significantly differences vs C1 group. B. IL-10 *P<0,05 significantly differences vs C2 group. C. IgA *P<0,05 significantly differences vs C1 group.

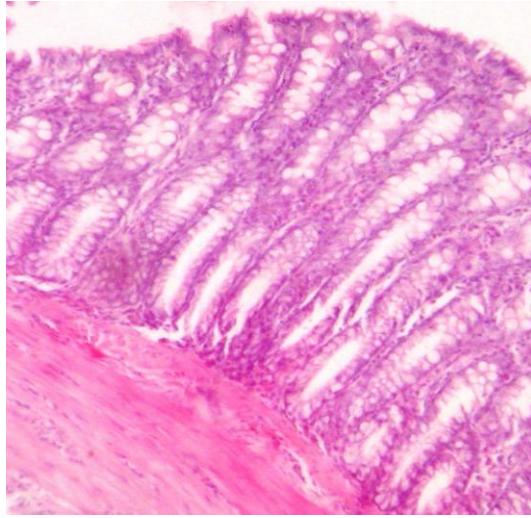
	Rate of survival to simulate gastric juice		
	15:0 (CFU.mL ⁻¹)	30:0 (CFU.mL ⁻¹)	2h:0 (CFU.mL ⁻¹)
G1	23% (7X10 ⁸)	-	-
G2	38% (3X10 ⁹)	-	-
G3	-	-	-
G4	46% (2,7X10 ⁹)	7% (4X10 ⁸)	-
G5	43% (1,5X10 ⁹)	14% (5X10 ⁸)	0,3% (1,2X10 ⁷)
G6	56% (3,7X10 ⁹)	5% (3X10 ⁸)	-
G7	75% (6,5X10 ⁹)	3% (2,3X10 ⁸)	0,2% (2,1X10 ⁷)
G8	93% (5,1X10 ⁹)	5%(3X10 ⁸)	-
G9	26% (9,2X10 ⁸)	4%(1,5X10 ⁸)	3% (1,1X10 ⁸)

Table 1. Rate of survival to simulated gastric conditions. In parenthesis the number of viable cells in each time.

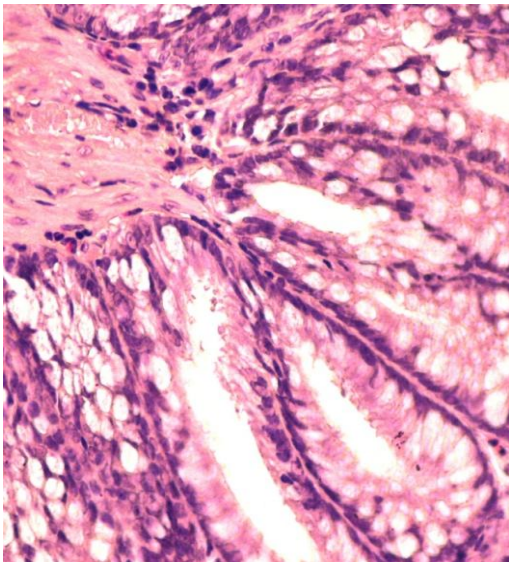
A



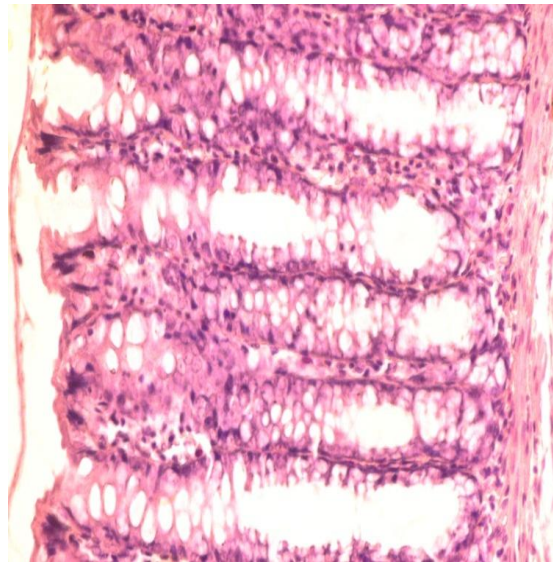
B



C



D



E

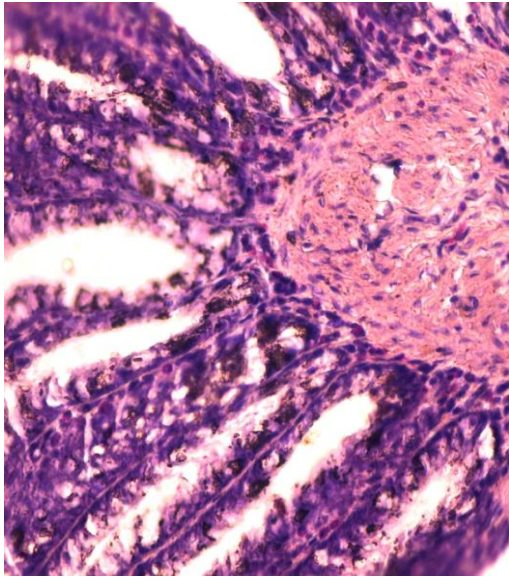


Fig. 4: Histological analysis of colonic tissue. A: Group with colitis without treatment. B: Negative control; C.D: Experimental; E: LAB single strain (HE, light microscope, 400x.)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre saúde e nutrição tem promovido uma busca cada vez maior por alimentos com propriedades ativas para prevenção ou tratamento de doenças. Produtos contendo probióticos destacam-se como alimentos funcionais, tendo seus efeitos relatados em diversas apresentações clínicas. Esta grande demanda, tem levado cientistas e fabricantes a investirem na busca de linhagens não derivadas do homem que apresentem efeitos cada vez mais específicos para determinada patologia. Nesse sentido, esse trabalho verificou o potencial probiótico de linhagens de bactérias lácticas isoladas do processo de fermentação do cacau, em um modelo experimental de colite. Constatou-se que a utilização de combinações de linhagens foram efetivas na redução da inflamação, o que foi observado a partir da redução na concentração sérica de citocinas inflamatórias, e no número total e diferencial de leucócitos sanguíneos, aumento de IL-10 e IgA, além de redução do dano histológico. A utilização de uma linhagem isolada não apresentou efeitos na remissão da colite. Os resultados desse trabalho apontam uma tendência na busca de fontes extra-intestinais de microrganismos probióticos, reforçando a quebra do paradigma da necessidade da origem humana dessas linhagens. Este estudo é pioneiro na exploração biotecnológica de bactérias lácticas da fermentação do cacau. Estudos posteriores em modelos isogênicos poderão esclarecer melhor os mecanismos de ação destes probióticos como moduladores do sistema imunológico. Triagens clínicas em humanos são ainda necessárias para adição desses microrganismos em um produto comercializável.

REFERÊNCIAS

- ARDHANA, M.M., FLEET, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**. 86: 87– 99. 2003.
- ARVOLA, T., LAIHO, K., TORKKELI, S., MYKKÄNEN, H., SALMINEN, S., MAUNULA, L., ISOLAURI E. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. **Pediatrics**. 104: e64. 1999.
- ASAHARA, T., SHIMIZU, K., NOMOTO, K., HAMABATA, T., OZAWA, A., TAKEDA, Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with shigatoxin- producing *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**. 72: 2240–2247. 2004.
- BEGLEY, M., GAHAN, C.G.M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**. 29; 625–651. 2005
- BIBILONI, R., FERNANDO, P., DE ANTONI, G.L. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia **Anaerobe**. 5: 519-524. 1999.
- BORRIELLO, S.P., HAMMES, W.P., HOLZAPFEL, W., MARTEAU. P., SCHREZENMEIR, J., VAARA, M., VALTONEN, V. Safety of Probiotics That Contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. **Clinical Infectious Diseases**. 36:775–80. 2003.
- BORRUEL, N., CAROL, M., CASELLAS, F., ANTOLÍN, F., DE LARA, F., ESPÍN, E., NAVAL, J., GUARNER, F., MALAGELADA, J.R. Increased mucosal tumour necrosis factor a production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria **Gut**. 51: 659–664. 2002.
- BOUMA, G., STROBER, W. The immunological and genetics basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**. 3: 521-533. 2003.
- BRAAT, H., VAN DEN BRANDE, J., VAN TOL, E., HOMMES, D., PEPPELENBOSCH, M., VAN DEVENTER, S. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. **American Journal Clinical Nutrition**. 80: 1618-25. 2004.
- BRIGIDI, P., VITALI, B., SWENNEN, E., BAZZOCCHI, G., MATTEUZZI, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Research in Microbiology**. 152: 735–741. 2001.

- BRIZUELA, M.A., SERRANO, P., PÉREZ, Y. Studies on Probiotics Properties of Two Lactobacillus Strains **Brazilian archives of biology and technology**. 44: 95 – 99. 2001.
- Bujňáková D, Vlková E, Rada V, Kmeť V. Aggregation of lactobacilli and bifidobacteria with *Escherichia coli* O157. *Folia Microbiologica*. 2004; 49: 143-144.
- CAMU, N., DE WINTER, T., VERBRUGGHE, K., CLEENWERCK, I., VANDAMME, P., TAKRAMA, J.S., VANCANNEYT, M., DE VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 1809–1824. 2007.
- CANNON, J.P., LEE, T.A., BOLANOS, J.T., DANZIGER, L.H. Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**. 24: 31–40. 2005.
- CAREY, C.M., KOSTRZYNSKA, M., OJHA, S., THOMPSON, S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. **Journal of microbiological methods**. 73: 125-132. 2008.
- CARIO, E., PODOLSKY, D.K. Intestinal epithelial Tolerance versus intolerance of commensals. **Molecular Immunology**. 42: 887–893. 2005.
- CARVALHO, F.A., BARNICH, N., SIVIGNON, A., DARCHA, C., CHAN, C.H.F., STANNERS, C.P., DARFEUILLE-MICHAUD, A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. **The Journal of Experimental Medicine**. 206: 2179-2189. 2009.
- CASTAGLIUOLO, I., GALEAZZI, F., FERRARI, S., ELLI, M., BRUN, P., CAVAGGIONI, A., TORMEN, D., STURNIOLO, G.C., MORELLI, L., PALU, G. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 43: 197–204. 2005.
- CATS, A., KUIPERS, E.J., BOSSCHAERT, M.A., POT, R.G., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., KUSTERS, J.G. Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. **Alimentary and Pharmacology Therapeutics**. 17: 429-35. 2003.
- CENCI-GOGA, B.T., RANUCCI, D., MIRAGLIA, D., CIOFFI, A. Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage **Meat Science**. 78; 381-390. 2008.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L., COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract **Journal of Applied Microbiology**. 84: 759–768. 1998
- CHAUVIÈRE, G., COCONNIER, M.H., KERNÉIS, S., FOURNIAT, J., SERVIN, A.L. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. **Journal of General Microbiology**. 138: 1689-1696. 1992.

- CHEN, X., KOKKOTOU, E.G., MUSTAFA, N., BHASKAR, K.R., SOUGIOULTZIS, S., O'BRIEN, M., POTHOUKAKIS, C., KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **Journal of biological chemistry**. 281: 24449-24454. 2006.
- CHEN, Y., YANAGIDA, F., SHINOHARA, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. **Letters in Applied Microbiology**. 40: 195–200. 2005.
- CLEUSIX, V., LACROIX, C., VOLLENWEIDER, S., LEBLAY, G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. **FEMS Microbiology Ecology**. 63: 56–64. 2008
- COEURET, V., GUEGUEN, M., VERNOUX, J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**. 71: 451–460. 2004.
- COLLADO, M.C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**. 40: 629-636. 2007.
- COLLADO, M.C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. ADHESION and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research Technology**. 226:1065–1073. 2008.
- COOMBES JL, MALOY KJ. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. **Seminars in Immunology**. 19: 116–126. 2007.
- CORR, S.C., LI Y, RIEDEL, C.U., O'TOOLE, P.W., HILL, C., GAHAN, C.G. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **PNAS**. 114: 7617-7621. 2007.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Immunology and Medical Microbiology**. 34: 245-253. 2002.
- DAMASKOS, D., KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. **British journal of clinical pharmacology**. 65: 453-467. 2008.
- DANESE, S., FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**. 12: 4807-4812. 2006.
- DANESE, S., SANS, M., FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity Reviews**. 3: 394– 400. 2004.
- DANIEL, C., POIRET, S., GOUDERCOURT, D., DENNIN, V., LEYER, G., POT, B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**. 72: 5799–805. 2006.

- DAVIS, C.D., MILNER, J.A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 20: 743–752. 2009.
- DIELEMAN, L.A., GOERRES, M.S., ARENDS, A., SPRENGERS, D., TORRICE, C., HOENTJEN, F., GRENTHER, W.B., SARTOR, R.B. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. **Gut**. 52:370–376. 2003.
- DIMITRIJEVIC, R., STOJANOVIC, M., ZIVKOVIC, I., PETERSEN, A., JANKOV, R.M., DIMITRIJEVIC, L., GAVROVIC-JANKULOVIC, M. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by Lactobacillus rhamnosus strain 68. **Journal of Applied Microbiology**. 107: 2108 – 2115. 2009.
- DORON, S.I., HIBBERD, P.L., GORBACH, S.L. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 42: 58-63. 2008.
- DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S., FITZGERALD, G., DALY, C., KIELY, B., O'SULLIVAN, G.C., SHANAHAN, F., COLLINS, J.K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73: 386-392. 2001.
- ELLI, M., ZINK, R., RYTZ, A., RENIERO, R., MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus spp.* Incompletely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**. 88:695–703. 2000.
- ELLI, M., ZINK, R., RYTZ, A., RENIERO, R., MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus spp.* Incompletely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**. 88: 695–703. 2000.
- FABIA, R., AR'RAJAB, A., JOHANSSON, M.L., WILLEN, R., ANDERSON, R., MOLIN, G., BENGMARK, S. The Effect of Exogenous Administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and Oat Fiber on Acetic Acid-Induced Colitis in the Rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 4: 155-166. 1993.
- FANG, S.B., LEE, H.C., HU, J.J., HOU, S.Y., LIU, H.L., FANG, H.W. Dose-dependent effect of *Lactobacillus rhamnosus* on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children. **Journal of Tropical Pediatrics**. 55: 297-301. 2009.
- FERNÁNDEZ, M.F., BORIS, S., BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**. 94: 449–455. 2003.
- FOTIADIS, C.I., STOIDIS, C.N., SPYROPOULOS, B.G., ZOGRAFOS, E.D. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**. 14: 6453-6457. 2008.
- FUJIWARA, S., HASHIBA, H., HIROTA, T., FORSTNER, J.F. Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to gangliotetraosylceramide. **Journal of Applied Microbiology**. 86: 615–621. 1999.

GÁLVEZ, S.L., LOISEAU, G., PAREDES, J.L., BAREL, M., GUIRAUD JP. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**. 2007; 114: 124–130.

GEORGIEVA, R., ILIEV, I., HAERTLÉ, T., CHOBERT, J.M., IVANOVA, I., DANOVA, S. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Dairy Journal**. 19: 696–702. 2009.

GOLOWCZYC, M.A., GUGLIADA, M.J., HOLLMANN, A., DELFEDERICO, L., GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G., SEMORILE, L., DE ANTONI, G. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. **Journal of Dairy Research**. 75: 211–217. 2008.

GOTTELAND, M., CRUCHET, S., VERBEKE, S. Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 15: 11–7. 2001.

GRATZ, S., TÄUBEL, M., JUVONEN, R.O., VILUKSELA, M., TURNER, P.C., MYKKÄNEN, H., EL-NEZAMI, H. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B-1 in rats. **Applied and environmental microbiology**. 72: 7398-7400. 2006.

GRATZ, S., WU, Q.K., EL-NEZAMI, H., JUVONEN, R.O., MYKKÄNEN, H., TURNER, P.C. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B-1 transport, metabolism, and toxicity in caco-2 cells. **Applied and environmental microbiology**. 73: 3958-3964. 2007.

GROBE, C., SCHERER, J., KOCH, D., OTTO, M., TAUDTE, N., GRASS, G. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeuU(YcdN), from *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. 62: 120–131. 2006.

GROZDANOV, L., RAASCH, C., SCHULZE, J., SONNENBORN, U., GOTTSCHALK, G., HACKER, J., DOBRINDT, U. Analysis of the genome structure of the non-pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **Journal of Bacteriology**. 186: 5432–5441. 2004.

GUARNER, F., SCHAAFSMA, G.J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. 39:237–238. 1998.

GUARNER, F., CASELLAS, F., BORRUEL, N., ANTOLÍN, M., VIDELA, S., VILASECA, J., MALAGELADA, J.R. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**. 56: 34–38. 2002.

GUO, Z., WANG, J., YAN, L., CHEN, W., LIU, X., ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **Food Science and Technology**. 42: 1640–1646. 2009.

HE, T., PRIEBE, M.G., ZHONG, Y., HUANG, C., HARMSSEN, H.J., RAANGS, G.C., ANTOINE, J.M., WELLING, G.W., VONK, R.J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. **Journal of Applied**

Microbiology. 104: 595-604. 2008.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition.** 73: 374–379. 2001.

HORD, N.G. Eukaryotic-Microbiota Crosstalk: potential Mechanisms for Health Benefits of Prebiotics and Probiotics. **Annual Review of Nutrition.** 28: 215-231. 2008.

HOSSEINI, S.V., ARLINDO, S., BÖHME, K., FERNANDEZ-NO, C., CALO-MATA, P., BARROS-VELAZQUEZ, J. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from non fermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology.** 107: 1392-1403. 2009.

ISOLAURI, E., RAUTAVA, S., KALLIOMAKI, M., KIRJAVAINEN, P., SALMINEN, S. Role of probiotics in food hypersensitivity. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.** 2: 263–71. 2002.

ISOLAURI, E., JUNTUNEN, M., RAUTANEN, T., SILLANAUKEE, P., KOIVULA, T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus Casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics.** 88: 90–97. 1991.

JACOBSEN, C.N., NIELSEN, R., HAYFORD, A.E., MØLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., PÆRREGAARD, A., SANDSTRO, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in humans. **Applied and environmental microbiology.** 65: 4949–4956. 1999.

JANKOWSKA, I., LAUBITZ, D., ANTUSHEVICH, H., ZABIELSKI, R., GRZESIUK, E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 1-6. 2008.

JESPERSEN, L., NIELSEN, D.S., HØNHOLT, S., JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research.** 5: 441–453. 2005.

Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002

JOSEPH, P.J., DAVE, R.I., SHAH, N.P. Antagonism between yogurt bacteria and probiotic bacteria isolated from commercial starter cultures, commercial yogurts, and a probiotic capsule. **Food Australia.** 50: 20–3. 1998.

JUNTUNEN, M., KIRJAVAINEN, V., OUWEHAND, C., SALMINEN, J., ISOLAURI, E. Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 293–296. 2001.

KAUFMANN, S.H.E. Elie Metchnikoff's and Paul Ehrlich's impact on infection biology. **Microbes and infection.** 10: 1417-1418. 2008.

KIEBLING, G., SCHNEIDER, J., JAHREIS, G. Long-term consumption of fermented dairy

products over 6 months increases HDL cholesterol **European Journal of Clinical Nutrition**. 56: 843–849. 2002.

KLAENHAMMER, T.R., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., AZCARATE-PERIL, M.A.A., ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews**. 29: 393–409. 2005.

KONINGS, W.N., KOK, J., KUIPERS, O.P., POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**. 3: 276–282. 2000.

KOS, B., SUSKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., SIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOSIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**. 94: 981–987. 2003.

KOSTINEK, M., BAN-KOFFI, L., OTTAH-ATIKPO M., TENIOLA, D., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W.H., FRANZ, C.M.A.P. Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. **Current Microbiology**. 56: 306–314. 2008.

LAHTEINEN, T., MALINEN, E., KOORT, J.M.K., MERTANIEMI-HANNUS, U., HANKIMO, T., KARIKOSKI, N., PAKKANEN, S., LAINE, H., SILLANPAA, H., SODERHOLM, H., PALVA, A. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. **Anaerobe**. 1–9. 2009.

LAPARRA, J.M., SANZ, Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. **Letters in Applied Microbiology**. 49: 695–701. 2009.

LEI, V., JAKOBSEN, M. Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. **Journal of Applied Microbiology**. 96: 384–397. 2004.

LENOIR-WIJNKOOP, I., SANDERS, M.E., CABANA, M.D., CAGLAR, E., CORTHER, G., RAYES, N., SHERMAN, P.M., TIMMERMAN, H.M., VANECHOUTTE, M., VAN LOO, J., WOLVERS, D.A.W. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. **Nutrition Reviews**. 65: 469–89. 2007.

LEU, R.K.L., BROWN, I.L., HU, Y., BIRD, A.R., JACKSON, M., ESTERMAN, A., YOUNG, G.M. A Synbiotic Combination of Resistant Starch and *Bifidobacterium lactis* Facilitates Apoptotic Deletion of Carcinogen-Damaged Cells in Rat Colon. **Journal of Nutrition**. 135: 996–1001. 2005.

LEVRI, K.M., KETVERTIS K., DERAMO, M., MERENSTEIN, J.H., D'AMICO, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. **The Journal of Family Practice**. 54: 613–620. 2005.

LIN, P.W., MYERS, L.E., RAY, L., SONG, S.C., NASR, T.R., BERARDINELLI, A.J., KUNDU, K., MURTHY, N., HANSEN, J.M., NEISH, A.S. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**. 47: 1205–1211. 2009.

LIONG, M.T. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated

- Mechanisms and In-vivo Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**. 9: 854-863. 2008.
- MACK, D.R., AHRNE, S., HYDE, L., WEI, S., HOLLINGSWORTH, M.A. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**. 52: 827–833. 2003.
- MACPHERSON, A.J., UHR, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. **Science**. 303: 1662-1665. 2004.
- MADSEN, K.L., DOYLE, J.S., JEWELL, L.D., TAVERNINI, M.M., FEDORAK, R.N. *Lactobacillus* Species Prevents Colitis in Interleukin 10 Gene-Deficient Mice. **Gastroenterology**. 116: 1107–1114. 1999.
- MAGALHAES, J.G., TATTOLI, I., GIRARDIN, S.E. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Seminars in Immunology**. 19: 106–115. 2007.
- MARAGKOUidakis, P.A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**. 16: 189–199. 2006.
- MARTEAU, P., LEMANN, M., SEKSIK, P., LAHARIE, D., COLOMBEL, J.F., BOUHNİK, Y., CADIOT, G., SOULE, J.C., BOURREILLE, A., METMAN, E., LEREBOURS, E., CARBONNEL, F., DUPAS, J.L., VEYRAC, M., COFFIN, B., MOREAU, J., ABITBOL, V., BLUM-SPERISEN, S., MARY, J.Y. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. **Gut**. 55: 842–7. 2006.
- MARTÍN, R., DELGADO, S., MALDONADO, A., JIMÉNEZ, E., OLIVARES, M., FERNÁNDEZ, L., SOBRINO, O.J., RODRÍGUEZ, J.M. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. **Journal of Dairy Research**. 76: 418-425. 2009.
- 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. **Journal of Applied Microbiology**. 475 – 479. 1995.
- MISHRA, V., PRASAD, D.N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics International. **Journal of Food Microbiology**. 103: 109–115. 2005.
- MOHAMMED, M., EL-AZIZ, H.A., OMRAN, N., ANWAR, S., AWAD, S., EL-SODA, M. Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. **International Journal of Food Microbiology**. 128: 417–423. 2009.
- MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality **International Dairy Journal**. 17: 1278–1283. 2007.
- MUSIKASANG, H., TANI, A., H-KITTIKUN, A., MANEERAT, S. Probiotic potential of

lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. 25: 1337–1345. 2009.

NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R., CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition**. 39: 13–126. 1999.

NAJJARI, A., OUZARI, H., BOUDABOUS, A., ZAGOREC, M. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. **International Journal of Food Microbiology**. 121: 342-351. 2008.

NIELSEN, D.S., TENIOLA, O.D., BAN-KOFFI, L., OWUSU, M., ANDERSSON, T.S., HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**. 114: 168–186. 2007.

NISHITANI, Y., TANOUE, T., YAMADA, K., ISHIDA, T., YOSHIDA, M., AZUMA, T., MIZUNO, M. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **International Immunopharmacology**. 9: 1444–1451. 2009.

OSMAN, N., ADAWI, D., AHRNE, S., JEPPSSON, B., MOLIN, G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Digestive Disease and Sciences**. 49: 320–7. 2004.

OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**. 82: 279–289. 2002.

PAN, X., CHEN, F., WUA, T., TANG, H., ZHAO, Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**. 20: 598–602. 2009.

PARVEZ, S., MALIK, K.A., AHKANG, S., KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. 100: 1171–1185. 2006.

PASSOS, F.M.L., SILVA, D.O., LOPEZ, A., FERREIRA, C.L.L.F., GUIMARES, W.V. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentation in Bahia. **Journal of Food Science**. 49: 205-208. 1984.

PEDERSEN, M.B., IVERSEN, S.L., SØRENSEN, K.I., JOHANSEN, E. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. 29: 611–624. 2005.

PERAN, L., CAMUESCO, D., COMALADA, M., NIETO, A., CONCHA, A., DIAZ-ROPERO, M.P., OLIVARES, M., XAUS, J., ZARZUELO, A., GALVEZ, J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. **World Journal of Gastroenterology**. 11: 5185–92. 2005.

PERDIGON, G., ALVAREZ, S., RACHID, M., AGÜERO, G., GOBBATO, N. Immune System Stimulation by Probiotics. **Journal of Dairy Science**. 1995; 78: 1597-1606.

- PERDIGÓN, G., ALVAREZ, S., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. **Journal of Dairy Research**. 58: 485-496. 1991.
- PERDIGÓN, G., DE MACIAS, M.E., ALVAREZ, S., OLIVER, G., DE RUIZ HOLGADO, A.P. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Immunology**. 63: 17-23. 1988.
- PIERCE, E.S. Where Are All the *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Patients with Crohn's Disease? **Plos Pathogens** 5:1-11. 2009.
- PRADO, F.C., PARADA, J.L., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**. 41: 111-123. 2008.
- PRANTERA, C., SCRIBANO, M.L., FALASCO, G., ANDREOLI, A., LUZI, C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomized controlled trial with *Lactobacillus GG*. **Gut**. 51: 405-409. 2002.
- PRIDMORE, R.D., PITTET, A.C., PRAPLAN, F., CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533
- RIVERA-NIEVES, J., GORFU, G., LEY, K. Leukocyte Adhesion Molecules in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**. 14: 1715-1735. 2008.
- RODRIGUES, L., VAN DER MEI, H., TEIXEIRA, J.A., OLIVEIRA, R. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber **applied microbiology and biotechnology**. 66: 306-311. 2004.
- ROOS, N.M., KATAN, M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **American journal of clinical nutrition**. 71: 405 – 411. 2000.
- SALZMAN, N.H., UNDERWOOD, M.A., BEVINS, C.L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Seminars in Immunology**. 19: 70-83. 2007.
- SANDERS, M.E. How Do We Know When Something Called "Probiotic" Is Really a Probiotic? A Guideline for Consumers and Health Care Professionals. **Functional Food Reviews**. 1: 3-12. 2009.
- SCHREZENMEIR, J., DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73:361-364. 2001.
- SCHULTZ, M., TIMMER, A., HERFARTH, H.H., SARTOR, R.B., VANDERHOOF, J.A., RATH, H.C. *Lactobacillus GG* in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. **BMC Gastroenterology**. 4: 5. 2004
- SCHWAN, R.F., WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 44, 1-17. 2004.

- SERVIN, A.L., COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 17: 741-754. 2003
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**. 83: 894–907. 2002.
- SHIBOLET, O., KARMELI, F., ELIAKIM, R., SWENNEN, E., BRIGIDI, P., GIONCHETTI, P., CAMPIERI, M., MORGENSTERN, S., RACHMILEWITZ, D. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. **Inflammatory Bowel Disease**. 8: 399-406. 2002.
- SHU, Q., GILL, H.S. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157 : H7 infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**. 189: 147-152. 2002.
- SMIT, G., SMIT, B.A., ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**. 29: 591–610. 2005.
- STEIDLER, L., HANS, W., SCHOTTE, L., NEIRYNCK, S., OBERMEIER, F., FALK, W., FIERS, W., REMAUT, E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**. 289: 1352-1355. 2000.
- STROBER, W., FUSS, I.J., BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Review of Immunology**. 20: 495–549. 2002.
- SZAJEWSKA, H., RUSZCZYŃSKI, M., RADZIKOWSKI, A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: A meta-analysis of randomized controlled trials. **The Journal of Pediatrics**. 149: 367. 2006.
- SZILAGYI, A. Prebiotics or probiotics for lactose intolerance: a question of adaptation. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70: 105-106. 1999.
- TAKAHASHI, M., TAGUCHI, H., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., KAMIYA, S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. 41: 219–226. 2004.
- TAKEDA, K., SUZUKI, T., SHIMADA, S.I., SHIDA, K., NANNO, M., OKUMURA, K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. **Clinical and Experimental Immunology**. 146:109–115. 2006.
- TIMMERMAN, H.M., KONING, C.J., MULDER, L., ROMBOUTS, F.M., BEYNEN, A.C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**. 96: 219-233. 2004.
- TODOROV, S.D., BOTES, M., GUIGAS, C., SCHILLINGER, U., WIID, I., WACHSMAN, M.B., HOLZAPFEL, W.H., DICKS, L.M.T. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 104: 465–477. 2008.

TODOROV, S.D., BOTES, M., GUIGAS, C., SCHILLINGER, U., WIID, I., WACHSMAN, M.B., HOLZAPFEL, W.H., DICKS, L.M.T. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 104: 465–477. 2008.

TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal of Food Microbiology**. 132: 117-126. 2009.

TODOROV, S.D., VON MOLLENDORFF, J.W., MOELICH, E., MULLER, N., WITTHUHN, R.C., DICKS, L.M.T. Evaluation of Potential Probiotic Properties of *Enterococcus mundtii*, Its Survival in Boza and in situ Bacteriocin Production. **Food Technology and Biotechnology**. 47: 178–191. 2009.

TURNER, P.C, WUB, Q.K., PIEKKOLA, S., GRATZ, S., MYKKANEN, H., EL-NEZAMI, H. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 2118–2123. 2008.

VAN HOOGMOED, C.G., VAN DER KUIJL-BOOIJ, M., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. **Applied and environmental microbiology**. 66: 659-663. 2000.

VINDEROLA, C.G., MOCCHIUTTI, P., REINHEIMER, J.A. Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products. **Journal of Dairy Sciences**. 85: 721–729. 2002.

VINDEROLA, C.G., PROSELLO, W., GHIBERTO, D., REINHEIMER, J.A. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese **Journal of Dairy Sciences**. 83:1905–1911. 2000.

VOULGARI, K., HATZIKAMARI, M., DELEPOGLOU, A., GEORGAKOPOULOS, P., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**. 21: 136-142. 2010.

WEINBERG, E.D. The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. **Perspectives in. Biology and Medicine**. 40: 578–583. 1997.

WINE, E., GAREAU, M.G., JOHNSON-HENRY, K., SHERMAN, P.M. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**. 300: 146-152. 2009.

XU, H., JEONG, H.S., LEE, H.Y., AHN, J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. **Letters in Applied Microbiology**. 49: 434–442. 2009.

ZAMUDIO-MAYA, M., EZ-ZAPATA, J.N., ROJAS-HERRERA, R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential

selective médium **Letters in Applied Microbiology**. 46: 402–407. 2008.

ZHANG, H., MASSEY, D., TREMELLING, M., PARKES, M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. **British Medical Bulletin**. 87: 17–30. 2008.

ZOCCO, M.A., DAL VERME, L.Z., CREMONINI, F., PISCAGLIA, A.C., NISTA, E.C., CANDELLI, M., NOVI, M., RIGANTE, D., CAZZATO, I.A., OJETTI, V., ARMUZZI, A., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 23: 1567–74. 2006.

ZOUMPOPOULOU, G., FOLIGNE, B., CHRISTODOULOU, K., GRANGETTE, C., POT, B., TSAKALIDOU, E. Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. **Journal of Food Microbiology**. 121: 18–26. 2008.

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](#)