



IVANA DE CÁSSIA RAIMUNDO

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E
AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
IMUNOMODULATÓRIA E INIBITÓRIA DO
KEFIR SOBRE *SALMONELA TYPHIMURIUM***

**LAVRAS-MG
2013**

IVANA DE CÁSSIA RAIMUNDO

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIA E INIBITÓRIA DO KEFIR
SOBRE *SALMONELA TYPHIMURIUM***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos para obtenção do
título de Doutor.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS - MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Raimundo, Ivana de Cássia.

Caracterização microbiológica e avaliação de propriedades imunomodulatória e inibitória do kefir sobre *Salmonella typhimurium* / Ivana de Cássia Raimundo. – Lavras : UFLA, 2013.
95 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Probióticos. 2. Kefir - Resposta imunológica. 3. Leveduras. 4. Antagonismo. 5. *Lactobacillus* spp. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.9

IVANA DE CÁSSIA RAIMUNDO

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIA E INIBITÓRIA DO KEFIR
SOBRE *SALMONELA TYPHIMURIUM***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos para obtenção
do título de Doutor.

APROVADA em de setembro de 2013.

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. Allan Kardec Carlos Dias	FACULDADE KENEDY

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2013**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado iluminado minha vida e minhas conquistas.

Ao meu marido Luiz Carlos Mussel, amor incondicional.

A minha filha Laura Magalhães, pela paciência da minha ausência e carinho nas horas difíceis.

A minha orientadora Professora Roberta Hilsdorf Piccoli que por mais vez acreditou em meu trabalho, minha eterna gratidão.

Ao professor Jaques Robert Nicoli pelas orientações.

A minha amiga e irmã Fernanda Delvivo, pelo carinho, companherismo e por fazer parte de minha vida.

A professora Dra. Rosa pela disponibilidade das análises histopatológicas.

Ao professor Carlos Rosa pelo acompanhamento e orientações de identificações de leveduras.

A professora Dra. Ariane Barata, pelas orientações das análises imunológicas.

A todas as pessoas que contribuíram pela realização deste trabalho.

RESUMO

Existem evidências dos benefícios dos probióticos no efeito barreira e modulação da função imunológica, reduzindo a translocação bacteriana (TB). Os objetivos desse estudo foram identificar a microbiota do kefir, avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp, a atividade antagonista *in vitro*, o papel destes no processo de translocação bacteriana de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, e determinar os níveis intestinais de INF- γ , IL-10 e intestinal de IgA quando os animais são alimentados ou não com Kefir. A identificação de bactérias lácticas foi realizada por análise restritiva do DNA ribossomal e a das leveduras foi realizada pela técnica de chaves taxonômicas e confirmadas pelo sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA, sendo isoladas 10 linhagens pertencentes a 4 espécies diferentes do gênero *Lactobacillus* e três espécies de leveduras. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi feita pelo método de diluição em Agar (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS NCCLS, 2007) e mostrou que todos os isolados foram sensíveis à ceftriaxena e resistentes à tetraciclina e cloranfenicol. O teste de antagonismo *in vitro*, realizado segundo a metodologia descrita por Tagg, Dajani e Wannamaker (1976) demonstrou a produção de substâncias antagonistas por quase todos os isolados contra todos os indicadores, exceto *Listeria monocytogenes*. Em dois grupos de camundongos que foram tratados (I) e não tratados (II) com kefir durante dez dias, o IgA realizado por ELISA no fluido do intestino delgado mostrou que a concentração foi maior no grupo I. Já a determinação de INF- γ e IL-10 no soro dos animais, também por ELISA, mostrou INF- γ maior no grupo II e IL-10 maior no grupo I. Em dois outros grupos de camundongos que foram tratados (I) ou não tratados (II) com kefir durante dez dias e então desafiados por via oral com *S. Typhimurium*, a TB ocorreu em maior proporção no fígado e baço do grupo II. O exame histopatológico mostrou danos mais graves no intestino e fígado dos animais do grupo II. Animais tratados com kefir apresenta maior concentração de IgA no fluido intestinal e de IL-10 no soro e menor de INF- γ no soro, o que poderia explicar uma TB e lesões histopatológicas menores quando desafiados com *S. Typhimurium*.

Palavras-chave: Probióticos. Kefir. *Salmonella. Typhimurium*. Resposta Imunológica. *Lactobacillus* spp. Leveduras. Antagonismo.

ABSTRACT

There are probiotics benefits evidences in the barrier effect and immunologic function modulation, reducing the bacterial translocation (BT). The objectives of this study involved identifying kefir microbiota, evaluate the susceptibility to *Lactobacillus* spp antimicrobial, the *in vitro* antagonist activity, their role in the bacterial translocation process of *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, and determine the intestinal levels of INF- γ , IL-10 and intestinal of IgA when the animals are fed or not with Kefir. Lactic bacteria identification was established through ribosomal DNA restrictive analysis and regarding the yeasts it was realized by the taxonomic keys technique and confirmed sequencing the D1/D2 region of the rDNA largest subunit, being isolated 10 strains which belonging to 4 *Lactobacillus* genus different species and three species of yeasts. The evaluation of the susceptibility to antimicrobial was accomplished by the agar dilution method (NCCLS, 2007) and it showed that all of the isolates were ceftriaxena sensitive and tetracycline and chloramphenicol resistant. The *in vitro* antagonism test, conducted according to the methodology described by Tagg et al. (1976) showed the production of antagonistic substances for almost all of the isolated against all of the measures, but *Listeria monocytogenes*. In two groups of mice that were treated (I) and untreated (II) with kefir during ten days, the IgA conducted by ELISA in the small intestine fluid showed that and the concentration was higher in group I. Since the determination of INF- γ and IL-10 in animals serum, also by ELISA, showed bigger INF- γ in group II and bigger IL-10 in group I. In two other mice groups which were treated (I) or untreated (II) with kefir for ten days and then orally challenged with *S. Typhimurium*, the TB occurred in greater proportion in the liver and spleen of group II. The histopathological examination showed bigger damage in the intestine and liver of the animals of group II. Kefir treated animals presents IgA larger concentration in the intestinal fluid and of IL-10 in the serum and less of INF- γ in the serum, which might explain a BT and smaller histopathological lesions when challenged with *S. Typhimurium*.

Keywords: Probiotics; Kefir; *Salmonella*; *Typhimurium*; Immune Response; ssp *Lactobacillus*; Yeasts, Antagonism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto do gel de agarose 1,4% mostrando o resultado da restrição enzimática do DNA do isolado <i>L. casei</i> * 57
Figura 2	Concentração em IgA total no fluido intestinal de camundongos tratados ou não tratados com kefir. 69
Figura 3	Concentração em INF- γ no soro de camundongos tratados ou não com kefir e desafiados com <i>Salmonella</i> 70
Figura 4	Concentração em IL-10 no soro de camundongos tratados ou não com kefir. 71
Figura 5	Aspecto histopatológico do intestino ileodistal de animais tratados ou não com kefir e desafiados com <i>Salmonella</i> Typhimurium. O intestino dos animais controle (A e C) apresentou edema da lamina própria (seta média) e das camadas musculares (C, seta grossa). Observou-se ainda interrupção da borda em escova e irregularidade da altura e largura das vilosidades (C, setas finas). Os vasos da lamina própria apresentaram-se ectásicos e com frequentes figuras de adesão intravascular (C, *). Os animais tratados com kefir apresentaram-se preservados em relação a estes parâmetros (B e D). 73

Figura 6 Aspecto histopatológico do fígado de animais tratados ou não com kefir e desafiados com *Salmonella* Typhimurium. O fígado dos animais controles apresentou infiltrado difuso (E, setas) de padrão misto, associado com alterações degenerativas dos hepatocitos (setas E e setas G). No fígado dos animais tratados com kefir houve preservação total da arquitetura lobular (F, seta indicando veia central do lóbulo hepático) e ausência de sinais degenerativos e inflamatórios significativos (F e H). 74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos.....	27
Quadro 2	Perfil de restrição dos produtos amplificados dos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA de espécies de <i>Lactobacillus</i>	47
Quadro 3	Grupos de estudo, tratamentos e análises para dosagem de IgA no fluido intestinal e de INF- γ e IL-10 no soro	52
Quadro 4	Grupos de estudo, tratamentos e análises	53
Quadro 5	Espécies de <i>Lactobacillus</i> isolados na solução aquosa de kefir e identificados por análise restritiva do DNA ribossomal amplificado	56
Quadro 6	Espécies de leveduras isoladas na suspensão aquosa de kefir.....	58
Quadro 7	Perfil de susceptibilidade (diâmetro de halo de inibição em milímetros) a antimicrobianos dos lactobacilos isolados de grãos de kefir.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padrões Físico-Químicos para o Kefir.....	33
Tabela 2	Perfil de antagonismo (diâmetro de halo de inibição em milímetros) a linhagens de referência de micro-organismos isolados do kefir produtores de ácido láctico.....	64
Tabela 3	Frequência (número de animais apresentando translocação no órgão/número total de animais analisados) e nível (log UFC/g de órgão \pm SD) de translocação de <i>Salmonella</i> Typhimurium para o fígado e baço de camundongos tratados ou não com kefir antes do desafio patogênico.	65

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado
ATCC	American type Culture Collection
BHI	Ágar Infusão de Cérebro e Coração
BPLS	Ágar verde brilhante vermelho fenol, lactose, sacarose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FOSHU	Alimento para uso específico na saúde
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GYMP	Caldo de conservação
IgA	Imunoglobulina A
IL – 6	Interleucina 6
IL – 10	Interleucina 10
IFN	Interferon
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MRS	Ágar De Man, Rogosa and Sharpe
MS	Ministério da Saúde
NAGE	Núcleo de Análise e Expressão Gênica
NLM	Nódulo Linfoide Mesentérico
P	Nível de significância
PBS	Tampão fosfato salina
Port.	Portaria
TB	Translocação Bacteriana
TNF alpha	Fator de necrose tumoral
TSA	Ágar triptona de soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia

KGy

Kilogray

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	O sistema imunológico.....	18
2.1.1	Alimentos funcionais	20
2.1.2	Probióticos	22
2.1.3	Efeitos benéficos na utilização dos probióticos.....	28
2.1.4	<i>Kefir</i>	30
2.1.4.1	Composição bioquímica do kefir	31
2.1.4.2	Características físico-químicas do kefir.....	32
2.1.5	Aplicações terapêuticas do kefir	34
2.1.6	Translocação bacteriana	36
2.1.7	Patogênese da translocação bacteriana.....	38
2.1.8	Translocação bacteriana, resposta imunológica e probióticos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Produção do kefir	42
3.2	Análises microbiológicas	42
3.2.1	Isolamento, quantificação e identificação de leveduras.....	42
3.2.2	Isolamento, quantificação e identificação de <i>Lactobacillus</i>	43
3.2.2.1	Extração de DNA.....	44
3.2.2.2	Amplificação da região intergênica 16S-23S	45
3.2.2.3	Digestão com enzimas de restrição	45
3.2.2.4	Sequenciamento.....	49
3.3	Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	49
3.4	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	50
3.5	Animais	51
3.5.1	Micro-organismos.....	51

3.5.2	Tratamentos, desafio experimental e análises	52
3.6	Testes de antagonismo <i>in vivo</i>	52
3.7	Avaliação da translocação bacteriana	53
3.8	Determinações imunológicas	54
3.8.1	Determinação da sIgA	54
3.8.2	Determinação de INF- γ e IL-10	54
3.9	Histopatologia.....	55
3.10	Análises estatísticas	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Isolamento, enumeração e identificação de bactérias.....	56
4.2	Isolamento, enumeração e identificação de leveduras.....	58
4.3	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	59
4.4	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	63
4.5	Translocação bacteriana	65
4.6	Determinação de IgA.....	68
4.7	Determinação de INF- γ	69
4.8	Determinação de IL-10.....	70
4.9	Histopatologia.....	72
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A população contemporânea com seu estilo de vida cada vez mais caótico está se tornando propícia e vulnerável a doenças degenerativas relacionadas com o sedentarismo e com hábitos alimentares incompatíveis com suas necessidades fisiológicas. O consumo de alimentos fermentados adicionados de probióticos diariamente tem mostrado melhorias na qualidade de vida humana e maior longevidade. Estes alimentos são considerados como funcionais, pois além cumprir seu papel básico e essencial de fornecer energia e proporcionar nutrição adequada para quem os consomem, são também responsáveis por agregar notórias melhorias no funcionamento do organismo humano, com processos que não estão vinculados com a nutrição convencional, sendo capazes de promover a saúde.

Estudos relacionados às esses alimentos buscam evidenciar características que possam indicar que a partir do consumo diário e regular desses produtos fermentados eles sejam capazes de agir como alimento nutraceutico, proporcionando assim novas alternativas para profilaxia e, ou terapêutica de doenças das mais variadas etiologias como câncer, estresse, hipertensão, hipercolesterolemia e terapêuticas hormonais.

O processo de elaboração dos alimentos fermentados adicionados de probióticos está relacionado diretamente com a suplementação da matéria prima com micro-organismos vivos que alteram suas características sensoriais e nutricionais obtendo-se assim produtos diferenciados de melhor digestibilidade e que proporcionam benefícios à vida de seu hospedeiro devido a colonização gastrointestinal tornando-os menos susceptível a doenças. Existem diversos tipos de alimentos com probióticos em estudo, sendo o mais relevante o iogurte adicionados de *Bifidobacterium* spp ou de *Lactobacillus* spp, e o kefir, originário das montanhas do Cáucaso.

Kefir é uma bebida levemente ácida, cujo pH varia entre 4,2 e 5,5, ou menor, podendo ser obtido pela fermentação de leite ou de água adicionada de rapadura por bactérias do ácido lático e diferentes leveduras. Sua propagação se dá por grãos de consistência gelatinosa, cuja coloração está relacionada diretamente com o substrato utilizado na fermentação. Os grãos são compostos pela associação simbiótica complexa de bactérias ácido lático e leveduras, encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis que são secretados por alguns desses micro-organismos.

O efeito benéfico do consumo de kefir é bem conhecido, auxiliando na digestão dos alimentos e na proteção da microbiota intestinal bem como seus efeitos sobre o sistema imunológico, atividade antitumorais, hipocolesterolêmicos e cicatrizante quando usado na elaboração de pomadas (FURUKAWA; MATSUOKA; YAMANAKA, 1990; KUBO; ODANI, NAKAMURA, 1992; RODRIGUES et al., 2005; TAMAI et al., 1996; THOREUX; SCHMUCKER, 2001; ZACCONI, 1995). Estudos mostram que o kefir, quando associado a *Lactobacillus acidophilus*, auxilia na recuperação da microbiota intestinal de pacientes submetidos a antibioticoterapia (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004).

Diversos fatores da constituição microbiana e das suas interações bioquímicas podem estar envolvidos no efeito protetor do kefir. A inibição do crescimento de patógenos parece estar associada ao efeito bactericida e bacteriostático do lactato e acetato em suas formas associadas. Também há registros de proteção pela síntese de bacteriocinas.

Existe uma variedade muito grande de aplicações da suspensão do kefir, algumas já com evidências científicas outras de sabedoria popular.

Portanto os objetivos desse estudo foram identificar a microbiota do kefir, avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp, a atividade antagonista *in vitro*, o papel destes no processo de translocação

bacteriana de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, e determinar os níveis intestinais de INF- γ , IL-10 e intestinal de IgA quando os animais são alimentados ou não com Kefir.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O sistema imunológico

O sistema imunológico é a defesa natural do organismo contra micro-organismos e outros agentes invasores. Ele é composto por várias células e moléculas sinalizadoras podendo ser dividido em sistema imune inato, que envolve o reconhecimento não específico do agente agressor, e sistema imune adaptativo, que inclui o reconhecimento específico de epítomos do agente agressor e o posterior envolvimento de uma série de células e citocinas, responsáveis por induzir a resposta imune celular e, ou, humoral. Logo após o reconhecimento de um patógeno, ocorre uma resposta apropriada visando a sua eliminação ou neutralização. A exposição subsequente ao mesmo patógeno induz uma resposta de memória imunológica, caracterizada por ser mais rápida intensa e específica (ANDERSEN et al., 2006).

O intestino possui sistema imune complexo e diferenciado que permite tolerar uma carga massiva de antígenos dietéticos e de micro-organismos comensais. Ao mesmo tempo é capaz de reconhecer e rejeitar micro-organismos que podem desafiar as defesas do corpo (BOURLIOUX et al., 2003). O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) representa a maior massa de tecido linfoide no corpo humano, contendo aproximadamente 70% de todos os linfócitos, sendo que a maioria dos anticorpos produzidos por indivíduos saudáveis é do tipo IgA, secretada pelo epitélio do intestino (ISOLAURI et al., 2001; MULLER; MAC PHERSON, 2006). O GALT é dividido em sítios indutores e efetores. Os sítios indutores incluem as estruturas mais organizadas, tais como: a) linfonodos mesentéricos que funcionam como uma segunda linha de defesa dos tecidos linfoides organizados, filtrando o conteúdo dos vasos linfáticos mesentéricos; b) placas de Peyer que são folículos linfoides

especializados na parede do intestino delgado que contêm células B virgens, células dendríticas foliculares e áreas ricas em linfócitos T (SPAHN; KUCHARZIK, 2004); c) folículos linfoides isolados, que são agrupamentos de 100 a 200 linfócitos B, localizados ao longo do intestino; e d) placas das criptas, caracterizadas por agrupamentos organizados de aproximadamente 1000 células localizadas na base das criptas intestinais delgado. Os sítios efetores incluem a lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (HAMADA et al., 2002; NEWBERRY; LORENZ, 2005).

Os tecidos linfoides difusos são compostos de plasmócitos produtores de IgA e células T maduras. As células efetoras encontram-se dispersas pela mucosa intestinal, sendo que a maioria dos linfócitos T intraepiteliais tem o fenótipo CD8 (citotóxicos ou supressores), enquanto os linfócitos T da lâmina própria apresentam o fenótipo CD4 (auxiliares). A lâmina própria também contém linfócitos da linhagem B, células B de memória e plasmócitos, sendo 70 a 90% desses produtores de IgA (BOURLIOUX et al., 2003).

As citocinas são glicoproteínas reguladoras intercelulares mobilizadoras de células envolvidas na imunidade bem como na resposta inflamatória adaptativa do hospedeiro, crescimento, diferenciação e morte celular, angiogênese e processos de desenvolvimento e reparo que auxiliam a restauração da homeostase. Elas são geralmente, produzidas por qualquer tipo celular nucleado em resposta a um estímulo nocivo (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; OPPENHEIM, 2001).

A IgA é a classe de anticorpo predominante em muitas secreções externas que possuem várias funções que servem para combater agentes infecciosos, tais como bactérias e vírus. Além disso, grande parte da IgA secretada na mucosa intestinal, diariamente, é dirigida contra a microbiota comensal, em uma via independente do auxílio de linfócitos T, sendo considerada parte do sistema imune inato (FAGARASAN; HONJO, 2002; MAC

PERSON et al., 2000; WOOF; MESTECKY, 2005). A IgA secretora (IgAs) é um dos principais fatores que previnem a translocação bacteriana, que pode resultar em sepse e morte no hospedeiro (BOLLINGER et al., 2003; EVERETT et al., 2004). Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (WIJBURG et al., 2006), demonstraram o papel de IgAs contra infecção por *S. Typhimurium* em camundongos nocaute para o receptor de imunoglobulina polimérica, onde foi observada uma invasão maior das placas de Peyer e da mucosa intestinal em comparação com o grupo controle.

2.1.1 Alimentos funcionais

“Alimento funcional” é um conceito relativamente recente, que tem sua origem no Japão. Na década de 80, o governo japonês lançou três programas de pesquisa sobre propriedades funcionais de alimentos que trariam benefícios à saúde. Assim, em 1991, uma nova categoria de alimentos foi definida como: alimentos para uso específico em saúde (*Food for Specific Health Use – FOSHU*), com resultados promissores, tanto sob o ponto de vista da melhoria da qualidade de vida quanto do ponto de vista econômico-financeiro. Logo os Estados Unidos e a Europa iniciaram estudos desta natureza (ASHWELL, 2002).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) segue a mesma linha de definição ao caracterizar uma propriedade funcional para um alimento, para fins de registro e rotulagem, como sendo “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c). Tal definição provém da Comissão de Assessoramento Técnico-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos criada com a atribuição de, entre outras, assessorar a ANVISA em assuntos científicos relacionados nessa área (BRASIL, 1999a).

Por meio da Portaria MS nº 18, de 30 de abril de 1999, o Ministério da Saúde, define e regulamenta os alimentos funcionais. De acordo com a norma, os alimentos funcionais,

são consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou com capacidade de reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas. Tais propriedades têm que ser comprovadas junto às autoridades competentes, quando do registro do alimento ou novo rótulo (BRASIL, 1999).

O termo “alimento funcional” é o mais utilizado no Brasil e no exterior, embora outros termos sejam também utilizados como: nutragênicos, nutracêuticos, biocêuticos, “*pharmafood*”, “*medical food*”, “*nutritional food*”, “*therapeutic food*”, “*fitness food*”, dentre outros (ASHWELL, 2002; ROSSI, 2001).

Observa-se que no mundo desenvolvido, no qual os consumidores são mais informados e envolvidos com as causas humanas e sociais, há enorme interesse por alimentos funcionais, ou seja, aqueles que oferecem além de nutrição, bem-estar e mais qualidade de vida aos indivíduos. Eles agem na prevenção e combate a doenças como o câncer e doenças cardiovasculares.

Pode-se afirmar que o interesse por alimentos funcionais é motivado, sobretudo, pela expansão dos conhecimentos científicos no que diz respeito à adoção de uma dieta saudável. Somado a esse fator, ocorre o aumento da procura por alimentos funcionais, fato que contribui para elevar os custos relacionados aos cuidados com a saúde (SIRÓ et al., 2008).

Há, portanto, no mundo contemporâneo, um consenso sobre o conceito de alimentos funcionais. Eles agem nas funções fisiológicas, protegendo o organismo contra doenças crônicas não degenerativas e infecções microbianas (KWAK; JUKES, 2001; MORAES; COLLA, 2006).

Para se ter uma ideia, em 2007, só no Brasil, a venda desses alimentos chegou a 500 mil dólares, valor correspondente a quase 1% das vendas dos demais alimentos. É de se notar que aproximadamente 65% do total de alimentos funcionais brasileiros são produtos probióticos (CRUZ; FARIA; VANDENDER, 2007).

Em suma, os alimentos contendo probióticos são grupos importantes de alimentos, relacionados a áreas fisiológicas bastante diferentes dos alimentos funcionais usuais – ricos em micronutrientes (ASHWELL, 2002). Pesquisadores consideram o grupo dos alimentos contendo probióticos muito significativo (ROSSI, 2001), chegando a considerá-los como precursores dos alimentos funcionais (OLIVEIRA, 2003).

O uso de probióticos, com o intuito de beneficiar a saúde, prevenindo e tratando doenças, aumentou, principalmente, devido à intensa incidência de micro-organismos resistentes a antibióticos registrada nos últimos anos (MARTINS et al., 2005; NICOLI; VIEIRA, 2003; TEITELBAUM; EALKER, 2002).

Usados nos tratamentos gastrointestinais, os probióticos são usualmente encontrados em produtos lácteos, iogurtes e outras variações de bebidas lácteas, como as fermentadas e kefir. Informados, os consumidores estão conscientes de que os alimentos fermentados apresentam micro-organismos vivos e de que eles são benéficos à saúde (ANTUNES et al., 2007; KEMPKA et al., 2008; VIEGAS, 2008).

2.1.2 Probióticos

Historicamente, existem relatos bastante antigos sobre os benefícios proporcionados pelo consumo de micro-organismos vivos, principalmente as bactérias ácido lácticas. A versão persa do Antigo Testamento, por exemplo,

atribui a longevidade de Abraão ao consumo de leite ácido. Já em 76 a.C Plínio, historiador romano, recomendou a ingestão do leite fermentado no tratamento da gastroenterite (DE VRESE, 2001; TEITELBAUM; WALKER, 2002).

O ganhador do prêmio Nobel de 1908, o cientista russo, Elie Metchnikoff, sugeriu que o leite fermentado fosse usado para modular a microbiota intestinal (NICOLI; VIEIRA, 2003). Ele acreditava que ao consumir iogurte contendo *Lactobacillus*, os camponeses búlgaros aumentavam sua expectativa de vida, pois, com essa prática, o número de bactérias produtoras de toxinas no intestino era drasticamente reduzido, o que favorecia a longevidade daqueles indivíduos (TEITELBAUM; WALKER, 2002).

Um passo importante ocorreu em 1930, quando um isolado de *Lactobacillus*, capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, foi isolada e cultivada. Na ocasião, a cultura, denominada *Lactobacillus casei* ssp. *shirota*, foi utilizada na produção do Yakult, leite fermentado, que originou, em 1935, a companhia do mesmo nome. Aos poucos, a pesquisa diminuiu drasticamente o seu ritmo, só voltando a acelerar novamente no final do ano de 1950 e início de 1960.

Na década de 40, indústrias já produziam leites fermentados em virtude de diversos trabalhos científicos que demonstravam os benefícios dos probióticos (ROSSI, 2001). Existem diversos tipos de alimentos adicionados de probióticos em estudo, dos quais os mais relevantes são os iogurtes, suplementados com *Bifidobacterium* spp. ou *Lactobacillus* spp., e o kefir. Segundo Otes e Cagindi (2003), o kefir é um alimento com probiótico natural. É uma bebida levemente ácida, com pH variando entre 4,2 e 5,5, ou menor, dependendo do tempo de fermentação, e tem sido consumido há milhares de anos na região das montanhas do Cáucaso, de onde é originário (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004).

A origem do termo probiótico é grega e significa “para a vida” (STEFE, Alves e Laino, 2008). Em 1965, Lilley e Stillwell empregaram a palavra probiótico ao se referirem a certa substância secretada por determinado micro-organismo capaz de estimular o crescimento de outro. O termo, porém, só foi utilizado com o sentido atual por Parker em 1974, que o definiu como organismos ou substâncias capazes de contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal (CAPPOLA; TURNES, 2004).

Em 1971, Sperti (apud FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO / WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002) definiu probiótico como o extrato de tecidos que estimulavam o crescimento microbiano. Atualmente, o termo se refere a micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Eles são comumente encontrados durante a fermentação do leite e seus derivados (SALOFF-COSTE, 1998a), quando ocorre a produção de ácido láctico, por número variável de linhagens bacterianas (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004).

Apesar da definição de probióticos focar a importância de sua viabilidade, há estudos que sugerem que micro-organismos não viáveis ou frações de células podem exercer algum efeito benéfico (KATARIA et al., 2009).

Os probióticos, geralmente, são usados em terapia oral e para profilaxia de distúrbios gastrointestinais. Alterações resultantes da mudança de dieta, estresse, tratamentos quimioterápicos ou com antibióticos podem provocar diferentes problemas gastrointestinais. Uma microbiota equilibrada influencia a transformação de moléculas produzidas pelo hospedeiro e o estado fisiológico do seu trato intestinal pela modulação da renovação de células epiteliais e do estado imunológico do hospedeiro (FERREIRA, 2001; FORESTIER et al., 2001; MAIA et al., 2001).

Em alimentos, os probióticos são encontrados em produtos lácteos, como iogurte, kefir, e bebidas lácteas que representam as principais categorias. Encontra-se a venda no mercado grande variedade de leites fermentados adicionados de probióticos. Esses produtos, além de possuírem grande aceitação pelo público em geral e excelente valor nutritivo, são veículos em potencial para o consumo de probióticos (VIEGAS, 2008).

Probióticos possuem diversos efeitos promotores da saúde, alguns já reconhecidos pela literatura pertinente. Dentre os efeitos profiláticos e terapêuticos atribuídos aos probióticos destacam-se: atividade anti-tumorigênica, melhora da motilidade intestinal, produção de H_2O_2 , prevenção da adesão das bactérias patogênicas no intestino, competição com bactérias patogênicas, produção de metabólitos capazes de neutralizar toxinas bacterianas *in situ* ou pela inibição de sua produção, redução do nível de colesterol, modulação da absorção de amônia, síntese de vitaminas do complexo B, absorção de cálcio, modulação do sistema imunológico, equilíbrio da relação insulina/glucagon, redução da lipogênese hepática, catabolismo do colesterol e metabolismo das lipoproteínas (FURUKAWA; MATSUOKA; YAMANAKA, 1990; FURUKAWA et al., 1991; GONCHAROVA et al., 1979; KUBO; ODANI; NAKAMURA, 1992; LINK-AMSTER et al., 1994; ISOLAURI; SALMINEN; SALMINEN, 1998; NICOLI et al., 2003; OUWEHAND, 1998; SALOFF-COSTE, 1998a; TAMAI et al., 1996; THOREUX; SCHMUCKER, 2001; ZACCONI, 1995).

Rossi (2001) lista várias espécies que podem ser consideradas probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium* e

Propionibacterium freudenreichii. Algumas foram isoladas pela iniciativa privada e são mantidas sob propriedade intelectual, como *Lactobacillus casei* ssp. *shirota*, *Lactobacillus rhamnosus* ssp. GG, e *Lactobacillus johnsonii*.

O micro-organismo, para ser considerado probiótico, deve apresentar as seguintes características: ser de origem humana (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; TEITELBAUM; WALKER, 2002); manter-se viável durante a estocagem e transporte; apresentar tolerância ao pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal; resistir a fagos e ao oxigênio (COPPOLA; TURNES, 2004); aderir à mucosa intestinal e colonizar, mesmo que de forma temporária, o trato gastrointestinal; produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino, impedindo ou reduzindo a aderência e a proliferação dos patógenos (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; SAAD, 2006; TEITELBAUM; WALKER, 2002).

Já para exercerem suas propriedades funcionais, os probióticos devem chegar aos sítios ativos em uma forma viável e ativa (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Entretanto, esses não são os únicos fatores necessários na ação probiótica, ou seja, o seu nível de ação deve ser suficientemente elevado (NICOLI; VIEIRA, 2003).

A quantidade de probiótico necessária para beneficiar a saúde não é clara. Rossi (2001) defende que os benefícios de um probiótico somente seriam alcançados com dosagem diária de 10^9 UFC/dia. A ANVISA recomenda a dose diária de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2007)

Para Nicoli et al. (2003), os probióticos apresentam possibilidades de aplicação para compensar a perturbação prevista (prevenção) ou instalada (tratamento) das funções da microbiota intestinal.

O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos. Eles são, usualmente, componentes não patogênicos da microbiota humana, como as bactérias produtoras de ácido láctico:

Lactobacillus, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e alguns *Streptococcus* e, ainda, uma levedura: *Saccharomyces boulardii* (BARBOSA et al., 2006).

Quadro 1 Exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos

Gêneros	Espécies
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus linhagens</i> LC1, La5, La7, <i>Gilililand</i> <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>shirota</i> , <i>Imunitass</i> , <i>NCC208</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus pracasei</i> ssp e <i>tolerans</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Fonte: Tamime (2002) e Saad (2006)

De forma genérica, os lactobacilos colaboram na digestão da lactose em pessoas com intolerância a esse dissacarídeo. Eles também diminuem a constipação e a diarreia infantil. Além disso, contribuem para proporcionar

resistência à ação das infecções por *Salmonella* e, ainda, para prevenir a “diarreia dos viajantes” e também para o alívio da síndrome do intestino irritável (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Já as bifidobactérias estimulam o sistema imunológico a produzirem vitaminas do complexo B e, também, a inibirem a produção de amônia e colesterol no sangue e a contribuir para reestabelecer a microbiota normal, após tratamento com antibióticos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Entre os poucos probióticos que não são de origem humana, a levedura *Saccharomyces boulardii* possui a seu favor o fato de ter sido exaustivamente testada em laboratório. Usada no combate a vários distúrbios gastrointestinais, seu uso tem sido sugerido na manutenção da doença de Crohn e na prevenção de diarreia em pacientes que recebem alimentação parenteral (MARTINS et al., 2005).

2.1.3 Efeitos benéficos na utilização dos probióticos

Ainda hoje, os mecanismos de ação dos probióticos não são totalmente conhecidos, entretanto, os mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos dessa ação são os mesmos atribuídos à microbiota digestiva normal, como: imunomodulação, proteção ecológica e contribuição nutricional ao hospedeiro (NICOLI; VIEIRA, 2000).

Há casos em que também são desconhecidos pontos importantes do tratamento, como: dose apropriada para a aplicação; o tempo indicado para alcançar o final da terapia; efeitos da interação dos probióticos com os alimentos no intestino e da interação entre os micro-organismos probióticos misturados (CARPUSO; FAVE; MORELLI, 2008).

Mesmo com essas pendências, são incontestáveis os benefícios do seu uso. Entre as aplicações clínicas dos probióticos, ressaltam-se: tratamento de

cáries dentárias, dermatites atópicas, infecções respiratórias, intolerância à lactose, síndrome do intestino irritável, câncer, infecções vaginal, infecção por *Helicobacter pylori* e pancreatites (CARPUSO; FAVE; MORELLI, 2008; DOUGLAS; SANDERS, 2008).

As considerações a seguir explicam a ação dos probióticos e seus efeitos sobre o organismo humano:

- a) Intolerância à Lactose: Muitos autores consideram que os probióticos contribuem para melhorar a digestão da lactose e para eliminar os sintomas de intolerância. Acredita-se que os mecanismos de ação envolvem alteração do pH intestinal, expressão da enzima B-galactosidase, efeitos benéficos sobre as funções intestinais e microbiota do cólon (DE VRESE et al., 2001; GILL; GUARNER, 2004; LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008).
- b) Prevenção e Redução dos Sintomas de Diarreia: O uso dos probióticos tem se mostrado eficiente para combater a diarreia infantil e as que acometem viajantes, reduzindo ou prevenindo sintomas (FOOKS; GIBSON, 2002; HUANG et al., 2002; NOMOTO, 2005; SULLIVAN; NORD, 2002).
- c) Inibição de *Helicobacter pylori*: Estudos indicaram que os probióticos contribuem para reduzir a carga microbiana e a inflamação provocada pela *Helicobacter pylori* em animais e humanos, entretanto, nenhum estudo identificou a erradicação do patógeno (FEDORAK; MADSEN, 2004; FLOCH; MONTROSE, 2005).
- d) Prevenção de Doenças Inflamatórias do Intestino (DII): A doença inflamatória do intestino é uma manifestação crônica e recorrente

que afeta o intestino delgado e o cólon. A manipulação terapêutica da microbiota intestinal normal por meio da adição de probióticos é uma opção que tem dado bons resultados (MUTLU; FARHADI; KESHAVARZIAN, 2002; REIF; KELLY, 2010).

2.1.4 Kefir

Também conhecido por kefir, kafir, kipp, e kefhir, a palavra parece oriunda do vocábulo turco *keif*, que significa “estar-bem”. Há controvérsias em relação ao termo propriamente dito. Segundo a resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entende-se por kefir o produto cuja fermentação se realiza com cultivos de acidolácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2000).

Diante de sua ação, a FAO/WHO (2002) sugeriu uma definição do kefir baseada na composição dos grãos e do produto final, ou seja, leite fermentado produzido pela inoculação de grãos de kefir ou cultura iniciadora, composta por *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, leveduras fermentadoras ou não de lactose crescendo em sinergismo.

Na Europa Oriental a ideia de que o kefir é capaz de promover benefícios à saúde é antiga, uma vez que é considerado um probiótico natural (RODRIGUES et al., 2005). Sua microbiota ativa é composta por grande variedade de micro-organismos que auxiliam na ação contra organismos patogênicos, na manutenção da microbiota do trato gastrointestinal e no processo de digestão (LEE et al., 2006).

Os grãos de kefir e seu sobrenadante são compostos de microorganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. O kefir tradicional é um subproduto do leite resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do kefir, conglomerado de organismos vivos constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. A composição da microbiota dos grãos de kefir depende de sua origem. Em algumas pesquisas foram descritas a presença de *Lactobacillus* homofermentadores e heterofermentadores, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* (ÂNGULO; LOPEZ; LEMA, 1993; CHEN; WANG; CHEN, 2008; JIANZHONG et al., 2009). São encontrados também vários gêneros de leveduras. Os fatores que interferem nesta composição parecem ser, principalmente, de ordem geográfica e do substrato utilizado para proliferação dos grãos (OLIVEIRA, 2003).

2.1.4.1 Composição bioquímica do kefir

Além de sua composição microbiológica, o kefir também possui uma matriz que fornece o aspecto gelatinoso a seus grãos, composto primariamente por proteínas (13%), debris celulares e polissacarídios (24%). O principal polissacarídio do kefir é o quefirano, um exopolissacarídio hidratado produzido por bactérias. O kefirano parece assemelhar-se a polissacarídios de glicogalactano (MICHELI et al., 1999), servindo ao grão de kefir como uma matriz de sustentação e coesão entre seus diversos componentes microbiológicos (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004). Clinicamente, o kefirano parece possuir alguma atividade anti-tumoral, uma vez que permitiu a inibição de até 59% no crescimento de tumores de camundongos inoculados com suspensão de carcinoma de Ehrlich (SHIOMI et al., 1982).

Além do quefirano, já foram encontradas na solução aquosa do kefir diversos ácidos orgânicos, tais como ácido orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico, acético, propiônico, butírico e hipúrico. Vitaminas do complexo B, como vitamina B₁, B₁₂, biotina, niacina (B₃), e pirodoxina (B₆), além de ácido fólico, vitamina K, cálcio, manganês e aminoácidos, também fazem parte da solução (SALOFF-COSTE, 1998b). Além destes, têm gás carbônico, acetaldeído, diacetil, acetoína e etanol, o último variando entre 0,05 e 3%, dependendo da atividade metabólica das culturas (SALOFF-COSTE, 1998b).

TAMIME et al. (2001) consideram que há diferenças significativas na quantidade de sólidos totais, proteínas, carboidratos e cinzas entre kefir elaborados com diferentes tipos de leites. Essa diferença nos conteúdos reflete as diferenças entre os leites das espécies distintas de mamíferos.

2.1.4.2 Características físico-químicas do kefir

O kefir se apresenta como uma suspensão de grãos gelatinosos e com pH ácido, variando de 3,3 a 5,5 (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2000), dependendo da atividade metabólica do conjunto. O crescimento otimizado de seus componentes microbiológicos depende da temperatura preferencial das espécies presentes. Uma faixa média de temperatura do cultivo situa-se entre 22° e 30° C, dependendo das cepas de interesse para o crescimento. Assim, *Leuconostoc citrovorum* possui uma temperatura ótima de 20°C, *Lactobacillus acidophilus*, de 38°C, e *Lactobacillus bulgaricus*, entre 43 e 46°C (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004).

A composição físico-química do kefir está intimamente relacionada com o tipo de leite empregado na sua fermentação. De modo geral, um kefir típico contém 89-90% (m/m) de umidade, 0,2% de lipídeos, 3,0% de proteína, 6,0% de carboidratos, 0,7% de cinzas e 1% de álcool e de ácido láctico.

Considera-se que o kefir possui 1,98 g/Lde dióxido de carbono e 0,48% de álcool. O conteúdo de CO₂ aumenta à medida que ocorre a elevação de kefir. (SARKAR, 2007).

A produção de CO₂ durante o manufaturamento do Kefir apresenta problemas relacionados com micro-organismos, pois eles continuam a crescer mesmo depois da estocagem, por isso, o recipiente usado para embalá-lo deve ser especial. É aconselhável optar por um recipiente capaz de suportar o acúmulo de pressão, como o vidro, ou flexível o suficiente para conter o volume de gás produzido, como, por exemplo, o plástico (FARNWORTH, 2005).

A composição físico-química para o kefir recomendada pela FAO/WHO (2003) e pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados inclui proteína, gordura e ácido láctico, conforme demonstrado pela Tabela 1.

Tabela 1 Padrões Físico-Químicos para o Kefir

Parâmetros	FAO/WHO (2003)	BRASIL (2007)
Proteína (%mm)	min. 2,8%	min. 2,9%
Gordura (%mm)	< 10,0 %	3,0 a 5,9%
Ácido Láctico (%mm)	min. 0,6%	< 1,0%
Etanol (%v/m)	não mencionado	0,5 a 1,5%

Fonte: Brasil (2007) e FAO/WHO (2003)

O álcool produzido durante o processo de fermentação para a produção do kefir surge devido às leveduras, todavia, também é possível que resulte do co-metabolismo da lactose e citrato pelos *Leuconostoc* (REA et al., 1996). Há também evidências de que as leveduras exerçam importante papel na preparação de produtos lácteos fermentados. No processo, elas podem alterar o pH do meio; fornecer etanol, CO₂ e nutrientes essenciais como aminoácidos e vitaminas. (FARNWORTH, 2005).

2.1.5 Aplicações terapêuticas do kefir

Existe grande variedade de aplicações medicinais do kefir, algumas já com respaldo científico caracterizado. De modo geral, o kefir parece atuar sobre a microbiota intestinal, propiciando o estabelecimento de bactérias benéficas e eliminando as patogênicas; na melhora da digestibilidade alimentar, por meio da atividade enzimática de suas diferentes cepas e na mediação de efeitos imunomoduladores e protetores, por intermédio dos inúmeros metabólitos secretados pelo kefir (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004).

Pool-Zobel, Munzner e Holzapfel (1993) mostraram propriedades antigenotóxicas em ensaios mutagênicos com *S. Typhimurium*. Atividade anti-tumoral também foi relatada por Kubo, Odani e Nakamura (1992), quando da inibição do crescimento de ascite de Erhlich pela administração oral de kefir (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004). Imunoproteção e diminuição do crescimento tumoral foram também observadas com a administração oral do polissacarídeo quefirano (MURIFUSHI; MIZUGUCHI; AIBARA, 1986; ZUBILLAGA et al., 2001).

Outras propriedades sugeridas no uso terapêutico do kefir incluem incremento de massa corpórea (VASS; SZAKALY; SCHMIDT, 1984), regeneração hepática (SCHMIDT; VASS; SZAKALY, 1984), redução dos efeitos de intolerância à lactose (ALM, 1982; DE VRESE; KELLER; BARTH, 1992), proteção contra infecção intestinal (ORLOVA; KASATKINA; OKHAPKINA, 1980), tratamento de bronquite, tuberculose e pneumonia (ORMISSON; SOO, 1976) e efeito sobre *Helicobacter pylori* (BOHMLER et al., 1996, ZUBILLAGA et al., 2001).

O kefir age contra enorme variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ter efeito positivo sobre alguns fungos. Embora não se possa definir, até o momento, o mecanismo exato da sua ação, há evidências de

que alguns compostos inibitórios do kefir, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos sejam responsáveis pela morte dos micro-organismos patogênicos (PĂUCEAN; SOCACIU, 2008; SILVA et al., 2009).

Além disso, os micro-organismos presentes nos grãos de kefir possuem atividade B-galactosidade e o kefir pode ser tão efetivo quanto o iogurte no combate à intolerância à lactose. Ele contém menos lactose que o leite e sua ingestão melhora a digestão desse carboidrato e reduz a flatulência em até 71% dos casos (LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007).

Outra ação importante do Kefir é o combate ao colesterol. Liu, Chen e Lin (2006) observaram que os níveis de triglicérides séricos, as concentrações de colesterol no fígado e, principalmente, da fração não HDL, foram drasticamente reduzidos pela dieta à base de leite de soja, kefir de leite ou kefir de soja em hamsters em experiência de oito semanas.

Estudos demonstraram o efeito inibidor do kefir sobre tumores e a proliferação de células cancerígenas (NINANE; MUKANDAYAMBAJE; BERBEN, 2009). Liu, Chen e Lin (2005) demonstraram a atividade antimutagênica do kefir recorrendo ao ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*. Na oportunidade, eles observaram que tanto o kefir do leite quanto o kefir do extrato hidrossolúvel de soja demonstraram atividade antimutagênica significativa superior do que a exercida pelo leite ou extrato hidrossolúvel de soja. Eles sugerem que a atividade antimutagênica do kefir do leite pode ser justificada, em parte, pela liberação de peptídeos das proteínas do leite durante a fermentação.

Com mais de mil anos de consumo, os micro-organismos do kefir não se mostraram patogênicos e as suspensões de kefir foram capazes de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (ANSELMO; VITÓRIA; LAUSADA, 2001; KOROLEVA, 1988).

O kefir pode ser preparado em água açucarada, suco de frutas, mel, sopa de soja, leite e quaisquer veículos que permitam aos seus micro-organismos fermentarem a solução nutritiva e se multiplicarem.

O método tradicional de produção do kefir é indesejável, pois a microbiota diversificada e variável dos grãos dificulta a obtenção de um inóculo com composição ideal e constante (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 1997).

Em termos gerais, é possível dizer que as características do kefir estão associadas a numerosos fatores, entre os quais se destacam: a quantidade de micro-organismos e a proporção de espécies entre si; a razão grãos, leite, temperatura e tempo de incubação; agitação durante a fermentação; higiene durante a separação dos grãos; lavagem dos grãos e armazenamento sob refrigeração (ERTEKIN; GUZEL-SEYDIM, 2005; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 1997; GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

2.1.6 Translocação bacteriana

O termo translocação bacteriana foi usado inicialmente para descrever o mecanismo de passagem de bactérias do trato gastrointestinal para locais extra-intestinais como os linfonodos mesentéricos, baço, fígado, rins e sangue (BERG; GARGLINTON, 1979; FULLER; JAINE-WILLIAMS, 1970; WOLOCHOW; HILDEBRAND; LAMANNA, 1996). Atualmente, o termo engloba a passagem, através do epitélio intestinal, de micro-organismos viáveis e não viáveis, bem como de produtos microbianos (WIEST; RATH, 2003). Uma vez atravessado a barreira epitelial, os micro-organismos na cavidade peritoneal dão origem à peritonite ou à passagem para outros órgãos, promovendo sepse (DEITCH et al., 1990).

Os mecanismos que controlam este evento dependem de múltiplos fatores relacionados aos micro-organismos e ao hospedeiro (WELLS, 1990).

Estudos têm demonstrado que a translocação bacteriana pode ser causada ou estimulada por choque hemorrágico, obstrução intestinal, nutrição parenteral total, imunossupressão, pancreatite aguda, traumas e antibioticoterapia (MAEJIMA; DEITCH; BERG, 1984; SALMAN et al., 1992).

Esta definição pode ser utilizada também para descrever a travessia transmural de componentes da parede celular de bactérias, tais como lipopolissacarídeos e polissacarídeos peptidoglicanos. Após a translocação, a bactéria e/ou seus produtos de metabolismo e componentes de parede celular passam para os linfonodos mesentéricos e, a partir daí, podem disseminar pelo corpo, podendo causar a morte do hospedeiro. Estudos em centros de tratamento intensivo estão sempre relacionando a translocação como o principal contribuinte para septicemia, choque e disfunção multi-sistêmica dos órgãos em humanos (LICHTMAN, 2001).

Vários mecanismos foram propostos para explicar este processo: a alteração da permeabilidade do epitélio intestinal, o aumento da população bacteriana no lúmen e/ou a diminuição das defesas imunológicas do hospedeiro, além, também de fatores ambientais como a dieta e o estresse que podem alterar o balanço ecológico no trato gastrintestinal favorecendo a translocação (BERG, 1995).

A translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos, que são os primeiros órgãos encontrados na rota de translocação a partir do lúmen intestinal, é rapidamente promovida pelo supercrescimento microbiano. O grau de translocação de certas espécies da família *Enterobacteriaceae* para os linfonodos mesentéricos está diretamente relacionado à sua concentração no intestino delgado e ceco. Além disso, das várias espécies de bactérias autóctones, nem todas se translocam com a mesma eficiência (STEFFEN; BERG; DEITH, 1988). Na ordem decrescente de capacidade de translocação bacteriana encontram-se as bactérias Gram-negativas aeróbias facultativas, as

bactérias Gram-positivas aeróbias facultativas e as bactérias anaeróbias estritas (BERG, 1995).

2.1.7 Patogênese da translocação bacteriana

Berg (1995) propôs que a patogênese da translocação bacteriana ocorreria em vários estágios e que, em animais saudáveis, a bactéria frequentemente atravessaria a mucosa intestinal em baixos números, sendo eliminada *in situ* pelos órgãos linfoides do sistema retículo endotelial (LICHTMAN, 2001). No primeiro estágio da patogênese da translocação, a bactéria translocada geralmente não se espalha do complexo de linfonodos mesentéricos para outros órgãos e sítios, e o hospedeiro não apresenta sinais clínicos da infecção. No segundo estágio, que geralmente acontece por deficiência no sistema imune, a bactéria transloca-se do complexo dos linfonodos mesentéricos para outros sítios, tais como baço, fígado, pulmões e rins. A translocação bacteriana pela combinação de mecanismos culmina no terceiro estágio da patogênese da translocação, onde a bactéria translocada se espalha pela cavidade peritoneal e sangue. Neste último estágio pode ocorrer a recuperação ou morte do paciente por septicemia letal, sendo que este fato dependerá do crescimento bacteriano no intestino, grau de imunodeficiência, extensão dos danos à mucosa intestinal e patogenicidade da bactéria translocada (LICHTMAN, 2001).

Em aproximadamente todos os modelos experimentais utilizados nos estudos de translocação, as bactérias são detectadas nos linfonodos mesentéricos antes de serem detectadas em outros sítios, tais como baço, fígado, cavidade peritoneal, pulmões e sangue. Os macrófagos localizados nos linfonodos mesentéricos estão posicionados estrategicamente para reduzir a translocação no trato gastrointestinal; mas todos os componentes do sistema imune, incluindo a imunidade de mucosa (imunoglobulinas secretadas), imunidade celular

(macrófagos e células T) e imunidade humoral (imunoglobulinas séricas), estão envolvidos no controle da translocação bacteriana (BERG, 1995).

Desta maneira, a translocação bacteriana pode ser um passo importante para o entendimento da patogênese de certas infecções oportunistas em pacientes debilitados (OLIVEIRA et al., 2006).

Uma série de micro-organismos possui a capacidade de invadir, colonizar e causar doenças ao trato gastrointestinal. Um dos mais estudados e conhecidos é a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Essa espécie é representada por bacilo aeróbio facultativo, Gram-negativo, que incluem agentes etiológicos de doenças denominadas salmoneloses (BERGEY'S..., 1984). Seus sorotipos causam uma infecção alimentar que resulta em gastroenterite e os sintomas ocorrem dentro de 6 a 24 horas após a ingestão do alimento ou água contaminados, podendo durar até uma semana (LEE et al., 2006; SALYERS; WHITT, 1994; SASHINAMI; YAMAMOTO; NAKANE, 2006). Os mecanismos de enteropatogenicidade de *Salmonella* são complexos, sendo ainda não completamente compreendidos. Esta bactéria possui diversos fatores de virulência, como adesinas, exoenzimas, enterotoxinas e endotoxinas (KOO et al., 1984; MAKELA; VOLTONEV; VOLTONEM, 1973), além da capacidade de invadir a mucosa gastrointestinal, multiplicar-se, disseminar-se e sobreviver nas células do sistema retículo-endotelial (CARTER; COLLINS, 1974; STEFANOVA et al., 2007). O tratamento usual é feito principalmente com uso de antimicrobianos, principalmente ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol e cefalosporinas de terceira geração. Entretanto, como característica comum a esta classe de medicamentos, tem-se o problema da resistência e a transmissão de genes de resistência que são fatores muito importantes entre as bactérias entéricas, principalmente a *Salmonella*.

2.1.8 Translocação bacteriana, resposta imunológica e probióticos

Estudos vêm demonstrando que o uso de probióticos modula a composição da microbiota intestinal e inibe a resposta inflamatória. Esses efeitos podem ser explicados pela preservação da integridade da barreira intestinal após injúria ou estresse (LUYER et al., 2005).

Zareie et al. (2006) comprovaram que a administração de probióticos vivos (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus helveticus*) pode evitar a adesão bacteriana no epitélio intestinal e eliminar a translocação bacteriana para nódulos linfáticos mesentéricos em ratos submetidos a um estresse crônico. A translocação bacteriana em ratos submetidos ao choque hemorrágico também foi reduzida pelo emprego de probióticos (LUYER et al., 2005). Martins et al. (2007) demonstraram que a *Saccharomyces cerevisiae* 905 pode ser usada com potencial probiótico por reduzir os níveis de translocação bacteriana da *Salmonella Typhimurium* para os nódulos mesentéricos linfáticos, placas de Peyer, fígado e baço. Estudos realizados com ratos submetidos a queimaduras utilizaram o probiótico *S. boulardii* como regulador da microbiota intestinal e para prevenir a translocação bacteriana (HEREK; KARA; KALELI, 2004).

Muitos estudos vêm confirmando o uso potencial de agentes probióticos como redutores ou inibidores da translocação bacteriana em vários estados de enfermidade como choques hemorrágicos, desordens intestinais inflamatórias e infecciosas, queimaduras. Porém, mais estudos devem ser realizados a fim de avaliar o mecanismo de ação desses agentes e a resposta em seres humanos (HEREK; KARA; KALELI, 2004; LUYER et al., 2005; MARTINS et al., 2007).

Vários estudos demonstram a influência positiva do consumo de alimentos com micro-organismos de ação probiótica na resposta imunológica. Os mecanismos de ação desses agentes estão sendo elucidados e novas

informações importantes têm sido publicadas, ressaltando o seu efeito imunomodulador (KAILA et al., 1992; RODRIGUES et al., 2000).

Melhora na resposta imune ao rotavírus foi observada em grupo de 49 crianças, em estudo duplo-cego, com variedade de bactérias ácido lácticas. A administração do *Lactobacillus* GG aumentou a concentração sérica do anticorpo específico IgA durante a fase de convalescência (MAJAMAA et al., 1995). Estudos demonstraram que o uso do *Lactobacillus casei* promoveu a diminuição da diarreia em crianças e auxiliou na erradicação de colite recorrente causada pelo *Clostridium difficile* em crianças submetidas ao uso de antibióticos (ISOLAURI et al., 1991). Segundo Rodrigues et al. (2000) e Silva et al. (2004), a ingestão de *Saccharomyces boulardii* e *Bifidobacterium bifidum* estimulou a produção de anticorpos IgA e o sistema fagocitário, modulando desta forma o sistema imune do hospedeiro e aumentando sua resistência à bactérias enteropatogênicas. Foi demonstrado que efeitos deletérios causados por TNF- α e IFN- γ na função de células epiteliais intestinais são prevenidos por probióticos, justificando o seu uso em desordens inflamatórias (RESTA-LENERT; BARRETT, 2006).

Efeitos anticarcinogênicos foram atribuídos à inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou a estimulação da resposta imune. Kato, Endo e Yokokura (1994) relacionaram a administração de *Lactobacillus casei* com a indução de resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos, assim como a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos. A imunomodulação por agentes probióticos é a grande promessa de expansão de agentes terapêuticos e na prevenção de doenças (LEVY, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção do kefir

Os grãos de Kefir utilizados foram cedidos pelo laboratório de Fitofármacos da Universidade de Alfenas – Unifenas. Foi preparado em uma proporção de 10 g de grão, 10 g de açúcar mascavo e 500 mL de água estéril e armazenada por 24 horas sob condições ambiente. Após 24 horas, a água fermentada foi separada para utilização, os grãos foram lavados em água estéril e a cultura reiniciada conforme descrito por Schneedorf e Anfiteatro (2004).

3.2 Análises microbiológicas

Foram retirados assepticamente 25 mL da solução aquosa e homogeneizada em 225 mL de água peptonada (0,1%) e feitas diluições sucessivas de 10^{-1} – 10^{-6} .

3.2.1 Isolamento, quantificação e identificação de leveduras

Para isolamento e enumeração de leveduras, 0,1 mL das diluições previamente preparadas foi espalhado com auxílio de alça de Drigalsky em Agar Extrato de Malte-Extrato de levedura (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato de malte 0,3%, aguar 2,0%) suplementado com cloranfenicol (100 mg/mL). As placas foram incubadas por 3-5 dias a 25°C. As contagens de colônias foram expressas em \log_{10} de UFC/mL. Um representante de cada morfotipo foi estocado em caldo GYMP (glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, fosfato de potássio dibásico, 0,2% glicerol) a -86 °C. Os micro - organismos isolados foram identificados inicialmente

segundo metodologia padrão (YARROW, 1998) e com auxílio de chaves taxonômicas presentes em Kurtzman e Fell (1998).

A identificação bioquímica das leveduras foi confirmada por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA como descrito por Lachance et al. (1999). Para reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA, USA), conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas usando o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETEM 1000. O sequenciamento do DNA foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM, Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG). As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para a comparação com as sequências depositadas no GenBank. Para ser considerada pertencente a uma espécie, o isolado teve que apresentar uma sequência analisada 99% similar a outra já depositada no GenBank. Micro-organismos que apresentaram sequências com similaridade menor ou igual a 98% na região do DNA analisada foram definidas como “similares”, ou podendo representar uma nova espécie.

3.2.2 Isolamento, quantificação e identificação de *Lactobacillus*

A identificação das amostras de *Lactobacillus*, isolados da solução aquosa de kefir, no nível de espécie, foi realizada pela técnica de PCR-ARDRA, que consiste na amplificação, por PCR, do segmento intergênico do rDNA 16-

23S, empregando iniciadores que se anelam em regiões dos genes que codificam os rRNAs 16S e 23S de *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc* (KABADJOVA et al., 2002), seguida por digestão enzimática dos produtos amplificados, segundo Moreira et al. (2005).

3.2.2.1 Extração de DNA

As amostras bacterianas foram cultivadas em 10,0 mL de caldo MRS (Difco, Le Pont de Claix, France), em câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, USA), com atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂. Após incubação por 24 horas, a 37° C, as culturas foram centrifugadas a 1710 x g, em centrífuga B4i (Jouan Industrie S.A.S., Châteu Gontier, France), à temperatura ambiente, por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em 1,0 mL de LiCl 5M e a suspensão transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O material foi incubado por 1 hora a 37° C, sob agitação em Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Germany), a 1.400 rpm, à temperatura ambiente e, então, centrifugado a 20.800 x g (Eppendorf, Hamburg, Germany), por 1 minuto. O sedimento foi suspenso em 1 mL de água milli-Q estéril e o material centrifugado, novamente, a 20.800 x g, por 1 minuto. O sedimento foi suspenso em 1 mL de solução de lisozima (10 mg/mL em TE10 – Tris-HCl 1,25 M; EDTA 0,5 M, pH 8) e os tubos agitados, delicadamente. Após incubação a 37° C, por 1 hora, sob agitação, à 1.400 rpm, a suspensão foi centrifugada a 20.800 xg, por 4 minutos, e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o DNA foi extraído, utilizando-se kit comercial (Promega, Madison, USA), segundo instruções do fabricante.

A integridade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio. As amostras de DNA foram mantidas em freezer - 20°C até o momento de sua utilização.

3.2.2.2 Amplificação da região intergênica 16S-23S

Foram utilizados os iniciadores *forward* 16-1A 5' - GAATCG CTAGTAATCG- 3', correspondente aos nucleotídeos 1361 a 1380 do gene que codifica o rRNA 16S de *Lactobacillus casei*, e *reverse* 23-1B, 5'-GGGTTCCTCCATTCCGGA-3', correspondente aos nucleotídeos 123 a 113 do gene que codifica o rRNA 23s do *Lactobacillus casei* (MOREIRA et al., 2005; TILSALA-TIMISJARVI; ALATOSSAVA, 1997). A mistura de reação foi composta por 5 µL de DNA molde (10 ng/µL), 30 µL da PCR *Master Mix* (Promega), 6 µL de cada iniciador na concentração de 10 pmol/L e 13 µL de água quimicamente pura (Promega).

Foram utilizadas as seguintes condições de reação: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas em termociclador PCR Express PCYL001 (Thermo Hybaid, United Kingdom). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 100 V, por 1 hora. Após coloração com brometo de etídio, os géis foram observados em transluminador UV. A presença de três bandas correspondentes aos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA sugeriam a identificação do gênero *Lactobacillus*.

3.2.2.3 Digestão com enzimas de restrição

A identificação dos isolados foi realizada por Análise Restritiva do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) descrita por Moreira et al. (2005). Os fragmentos amplificados foram submetidos a tratamento com as seguintes endonucleases de restrição: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *EcoRV*, *DraI*, *SfuI*, *SspI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII* (Promega), de acordo com as instruções do

fabricante. A escolha das enzimas de restrição foi baseada no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% por 1 hora, a 100 V. Após coloração com brometo de etídio, os géis foram examinados sob luz ultravioleta. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas comparando-se o resultado da digestão enzimática de cada amostra com o padrão de digestão já estabelecido para cada espécie, obtido pela análise *in silico*. O Quadro 2 mostra o perfil de restrição para todas as espécies de *Lactobacillus* já identificadas pelo protocolo de ARDRA utilizado neste estudo.

Quadro 2 Perfil de restrição dos produtos amplificados dos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA de espécies de *Lactobacillus*

Identificação	<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>
<i>L. acidophilus</i>	---	+++	---	---	+--	---	---	---	---	+++	+++	+++
<i>L. agilis</i>	+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. alimentarius</i>	+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+--	---	+++	---
<i>L. animalis</i>	+++	---	---	---	---	---	+++	+++	++-	---	+++	---
<i>L. brevis</i>	+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---
<i>L. camelliae</i>	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---
<i>L. casei</i>	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---
<i>L. coleohominis</i>	+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. crispatus</i>	---	+++	---	---	+--	+++	---	---	---	+++	+++	+++
<i>L. delbrueckii</i>	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---
<i>L. farciminis</i>	+++	+--	---	---	---	---	+++	+++	+--	---	+++	---
<i>L. ferintoshensis</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---
<i>L. fermentum</i>	+++	---	+--	---	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. fructivorans</i>	+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+--	---	+++	---
<i>L. frumenti</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+--	---	---	---
<i>L. gasseri</i>	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+--	+++
<i>L. hilgardii A</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---
<i>L. hilgardii B</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---
<i>L. jensenii</i>	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---
<i>L. johnsonii</i>	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+--	---
<i>L. mucosae</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. murinus</i>	---	---	---	---	---	---	+++	---	+--	---	+++	---
<i>L. nageli</i>	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>L. panis</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. pantheris</i>	+++	+--	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---

“continua”

Quadro 2 “conclusão”

Identificação	<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>
<i>L.paralimentarius</i>	+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+--	---	+++	---
<i>L.paraplantarum</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---
<i>L.pentosus</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---
<i>L.perolens</i>	---	---	---	---	---	+++	---	---	+--	---	+++	---
<i>L.plantarum A</i>	+++	---	---	+++	+--	---	---	+++	+++	---	---	---
<i>L.plantarum B</i>	+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---
<i>L.pontis</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L. reuteri A</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+--	---	---	---
<i>L.reuteri B</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---
<i>L.rhamnosus</i>	---	---	---	---	---	+++	+++	---	+--	---	+++	---
<i>L. ruminis</i>	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+--	---	---	---
<i>L. sakei</i>	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---
<i>L.salivarius</i>	---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---
<i>L.sanfranciscensis</i>	+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---
<i>L.vaginalis A</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+--	---	--+	---
<i>L.vaginalis B</i>	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	--+	---

(+), ocorrência de digestão; (-), ausência de digestão. Para cada enzima, os símbolos indicam digestão dos espaçadores longo, médio e curto, respectivamente.

3.2.2.4 Sequenciamento

Quando não foi possível a identificação por ARDRA, a amostra foi submetida ao sequenciamento do rDNA 16S. A PCR foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 4.2.2.2, com exceção do iniciador que foi o de sequência *forward* 27F – 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e *reverse* 1492R – 5' GGTTACCTTGTTACGACTT – 3' que amplifica a região do rDNA 16S, segundo AMPE et al. (1998). Após excisão da banda correspondente ao fragmento de rDNA 16S, o produto foi purificado, empregando-se o GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA), conforme as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado no Núcleo de Análise e Expressão Gênica – NAGE (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit em sequenciador automática MegaBACETM 1000 Analysis Systems (Amersham Bioscience). Cada produto amplificado foi sequenciado em duplicata, nos sentidos senso e reverso.

A sequência obtida foi alinhada e comparada com sequências depositadas no *GenBank*, com o programa BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/library.vu.edu.au/BLAST)), algoritmo BLASTN. A sequência de similaridade maior ou igual a 98% com outra sequência de nucleotídeos foi considerada identificada.

3.3 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

As linhagens de *Lactobacillus* foram testadas quanto à susceptibilidade a antimicrobianos. Após o cultivo das bactérias, os testes de susceptibilidade foram realizados seguindo-se o método de diluição em ágar (NCCLS, 2007). As concentrações dos antibióticos foram determinadas utilizando-se como ponto de

partida os seus respectivos pontos críticos. Foram escolhidas diluições seriadas de 1:2 (duas diluições acima e duas diluições abaixo) a partir do ponto crítico de cada droga. Após 48 horas de incubação a 37 °C, em câmara de anaerobiose, foi avaliada a presença ou ausência de crescimento nas placas. Como controle positivo para os testes, foi utilizado *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e como controle negativo não foram inoculados micro-organismos. Quanto aos antimicrobianos, foram testadas drogas de diferentes classes: ceftriaxona (30 µg), amoxicilina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (45 µg), vancomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg) e amicacina (30 µg).

3.4 Teste de antagonismo *in vitro*

O teste foi realizado segundo metodologia descrita por Tagg, Dajani e Wannamaker (1976). Foram testadas as amostras bacterianas isoladas, repicadas em caldo MRS e incubadas a 37°C por 24 horas, em anaerobiose (Forma Scientific Company). Foram utilizados spots de 5 µL na superfície de ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em anaerobiose. Após a incubação, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e, então, expostas ao vapor de clorofórmio por 30 minutos e entreabertas por igual período de tempo, para a evaporação do clorofórmio residual. A revelação da presença de substância(s) antagonista(s) foi feita recobrando-se a placa com sobrecamada de Ágar Brain Heart Infusion (BHI) 0,75%, contendo, aproximadamente, 10⁶ UFC/mL da bactéria reveladora. O critério de determinação dos resultados foi a presença ou ausência de halo de inibição, independente de seu tamanho. Foram testadas as seguintes linhagens de referência como reveladora: *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Listeria*

monocytogenes ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.5 Animais

Os animais utilizados para os experimentos foram camundongos de ambos os sexos, da linhagem Swiss, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG com peso entre 20 e 30 gramas com idade entre 21 e 23 dias. Foram mantidos sob temperatura e umidade constantes, com ciclo de 12 h escuro/luz, acesso à dieta padrão para roedores (Purina, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo camundongos foram conduzidos de acordo com recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA- Brasil). O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal do Centro Universitário UNA e aprovado.

3.5.1 Micro-organismos

A linhagem de *Salmonella* Typhimurium foi isolada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG), cedida pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia Microbiana, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG, Belo Horizonte, MG). A bactéria foi mantida a -80°C em caldo BHI, contendo 20% de glicerol. O patógeno utilizado foi mantido em 0,5 mL da cultura de 18 h em caldo BHI suplementado com glicerina 80% esterilizada.

3.5.2 Tratamentos, desafio experimental e análises

Os animais foram separados em dois grupos, de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3 Grupos de estudo, tratamentos e análises para dosagem de IgA no fluido intestinal e de INF- γ e IL-10 no soro

Grupo de estudo	Tratamentos
a) Controle	Inoculação intragástrica diária de 0,1 mL de água durante 10 dias. no 11° dia os animais foram desafiados com inóculo da ordem 10^{-5} UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i> .
b) Experimental	Inoculação intragástrica diária de 0,1 mL de Kefir durante 10 dias no 11° dia os animais foram desafiados com inóculo da ordem 10^{-5} UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i> .
Para determinação da translocação bacteriana e histopatologia	
a) Controle	Inoculação intragástrica diária de 0,1 mL de água durante 10 dias, no 11° dia os animais foram desafiados com inóculo da ordem 10^{-5} UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i> .
b) Experimental	Inoculação intragástrica diária de 0,1 mL de Kefir durante 10 dias, no 11° dia os animais foram desafiados com inóculo da ordem 10^{-5} UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i> .

3.6 Testes de antagonismo *in vivo*

Os animais do grupo experimental receberam 0,5 mL/dia de solução aquosa de kefir e após 10 dias uma única dose de 0,1 mL com 10^5 UFC/mL de *Salmonella Typhimurium*, ambas por gavagem intragástrica. No grupo controle, os animais receberam água no lugar de kefir. Os animais foram separados em dois grupos, de acordo com o Quadro 4. Todos foram pesados diariamente para avaliação do ganho em peso e a mortalidade acumulada foi anotada. A sobrevivência dos camundongos foi avaliada até 28 dias após o desafio experimental por *Salmonella* nos grupos controle e experimentais.

Quadro 4 Grupos de estudo, tratamentos e análises

Grupo de estudo	Tratamentos
1	Solução aquosa de kefir 0,5 mL/ dia durante 10 dias e 0,1 mL de solução salina contendo 10^5 UFC/mL <i>S. Typhimurium</i> ; avaliação de mortalidade durante 28 dias
2	Água (0,5 mL/dia) durante 10 dias e 0,1 mL de solução salina contendo 10^5 UFC/mL <i>S. Typhimurium</i> ; avaliação de mortalidade durante 28 dias

3.7 Avaliação da translocação bacteriana

Após 48 horas do desafio patogênico, os animais foram eutanasiados e o fígado e baço removidos assepticamente, pesados e homogeneizados em tubos de vidros com solução salina 0,85%. Foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina. O plaqueamento foi realizado em ágar MacConkey (Merck, Darmstadt, Alemanha) para enumeração de colônias típicas de *Salmonella*, após incubação a 37°C, por 48h.

Com objetivo de confirmar a translocação de *Salmonella* para os órgãos dos animais experimentais, as colônias típicas de *Salmonella* em Agar MacConkey foram transferidas, pela técnica de plaqueamento de réplica (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004), para placas de ágar BPLS (Ágar verde brilhante vermelho fenol, lactose, sacarose, Merck). As colônias típicas em Agar BPLS foram transferidas para placas de ágar TSA (Agar tripticase de soja, Oxoid) e incubadas a 37°C, por 48 horas. Posteriormente, foi realizada análise sorológica (soro polivalente de *Salmonella*, Probac, Brasil) dessas colônias subcultivadas em Agar TSA para confirmação da identidade.

3.8 Determinações imunológicas

3.8.1 Determinação da sIgA

Na determinação da sIgA foram utilizados animais tratados e não tratados com solução aquosa de kefir, segundo TABELA 3 descrito anteriormente.

O conteúdo de sIgA presente no conteúdo do lúmen intestinal (intestino delgado) foi determinado por ELISA. Os camundongos foram anestesiados e sacrificados. O intestino delgado foi coletado e o seu conteúdo removido, pesado e diluído em PBS (Tampão fosfato salina) com 1% de inibidor de protease (P8340, Sigma) na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal por 2 ml de PBS. Após centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e armazenado a - 70°C em freezer até o uso. Após estocagem, as amostras de fluido intestinal foram submetidas à diluições seriadas em PBS e adicionadas em duplicatas nos poços de ELISA. A concentração em sIgA total foi determinada utilizando anticorpo anti-IgA de camundongo (M8769, Sigma) e detectado com uso de um anticorpo anti-IgA conjugado com a peroxidase (A4789, Sigma). A coloração foi desenvolvida com o-fenil-diamina (1,2-diaminobenzeno) (P9187 – OPD, Sigma) e absorvância a 492 nm foi determinada com leitor de placa (ELISA READER, 2550, Bio-Rad Lab., USA). A concentração total de sIgA padrão foi determinada utilizando IgA padrão de camundongos purificada (10601, Southern Biotechnology) (RODRIGUES et al., 2000).

3.8.2 Determinação de INF- γ e IL-10

Na determinação de INF- γ e IL-10 foram utilizados animais tratados e não tratados com solução aquosa de Kefir segundo item 4.5.2.

Os níveis de INF- γ e IL-10 no soro dos animais foram determinados por ELISA. As amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca e submetidas à centrifugação, a 1.000g, por 10 min. O soro obtido do sobrenadante foi congelado a -70°C até as análises. As citocinas foram determinadas usando *Kits* comerciais e seguindo o protocolo do fabricante (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

3.9 Histopatologia

Amostras do intestino delgado (íleo), baço e fígado dos animais foram dissecadas e fixadas em formalina 10%, inclusas em parafina e cortes de 3-5 μ m de espessura, corados por hematoxilina-eosina. As análises foram realizadas no Departamento de Patologia Geral/ICB/UFMG por uma patologista que recebeu as amostras codificadas. A decodificação foi feita somente após emissão do laudo.

3.10 Análises estatísticas

Os resultados obtidos do estudo de translocação bacteriana e dosagens de citocinas foram avaliadas pelo teste estatístico ANOVA e teste T para amostras independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0,05$ (OLIVEIRA, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, enumeração e identificação de bactérias

Após isolamento utilizando-se suspensão aquosa de uma amostra de kefir de acordo com o item 4.1, foi feita contagem segundo metodologia padrão.

O nível médio das bactérias totais do ácido láctico presentes na solução aquosa do kefir foi de $6,39 \pm 0,09$ log UFC/ml.

O Quadro 5 apresenta os resultados de identificação pela técnica de PCR-ARDRA das linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas da suspensão aquosa de kefir. Foram isolados 10 morfotipos diferentes que pertencem a quatro espécies do gênero *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei* (5), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactobacillus nagelei* (2) e *Lactobacillus satsumensis* (1).

Quadro 5 Espécies de *Lactobacillus* isolados na solução aquosa de kefir e identificados por análise restritiva do DNA ribossomal amplificado

Isolado	Espécies isoladas
1	<i>Lactobacillus satsumensis</i>
2	<i>Lactobacillus casei</i>
3	<i>Lactobacillus casei</i>
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	<i>Lactobacillus casei</i>
7	<i>Lactobacillus nagelei</i>
8	<i>Lactobacillus casei</i>
9	<i>Lactobacillus casei</i>
10	<i>Lactobacillus nagelei</i>

Em estudos, a identificação de *lactobacillus* heterofermentativos obtidos do grão de kefir foi confirmada por métodos moleculares, onde foi estabilizado o valor da técnica PCR-ARDRA para discriminar diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* (Figura1).

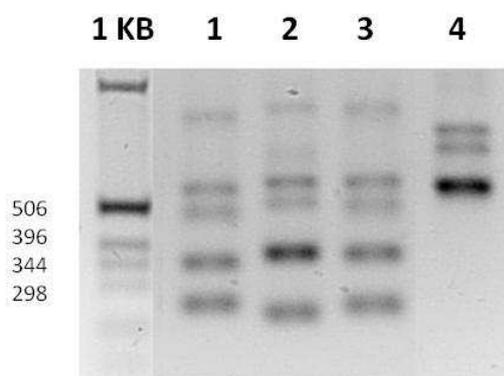


Figura 1 Foto do gel de agarose 1,4% mostrando o resultado da restrição enzimática do DNA do isolado *L. casei**

*As canaletas mostram: Marcado molecular 1 Kb, 1. *EcoRV*, 2. *DraI*, 3. *VspI*, 4. *HindI*.

Na literatura encontraram-se algumas variações com relação aos micro-organismos identificados. De acordo com Santos et al. (2003), o grão de kefir é formado por uma grande variedade de bactérias, as quais não foram completamente identificadas e a influencia geográfica do grão deve ser considerada para avaliação da diversidade dos micro-organismos.

Estes resultados confirmam em parte dados anteriores (ROY; SIROIS; VICENT, 2001), onde a análise por PCR-ARDRA foi utilizada para discriminação de espécies pertencentes ao grupo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*.

Pidoux et al. (1990) isolaram espécies até então desconhecidas como componentes do kefir. Foram identificadas *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, envolvidos com a produção de lactato; e *Lactobacillus hilgardii*, que utiliza sacarose para produção de arabinose e polissacarídeos. Marshall, Cole e Brooker (1984), isolaram *Lactobacillus desidiosus*, que fermenta L-arabinose e gluconato, enquanto que Marquina et al. (2002), encontraram *Lactococcus brevis* e *Lactobacillus paracasei*.

4.2 Isolamento, enumeração e identificação de leveduras

O nível médio das leveduras totais presentes na solução aquosa do kefir foi de $6,46 \pm 0,05$ log UFC/ml.

Foram isolados três morfotipos de leveduras e o Quadro 6 apresenta a identificação desses isolados. Pertencem a três espécies diferentes: *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces fermentati* e *Saccharomyces cerevisiae*).

Quadro 6 Espécies de leveduras isoladas na suspensão aquosa de kefir

Isolado	Espécies identificadas
1	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

Com relação às leveduras, identificou-se espécies fermentadoras (*Torulaspota delbrueckii* e *Zygosaccharomyces fermentati*) e não fermentadora (*Saccharomyces cerevisiae*), o que também foi encontrado por outros autores (ÂNGULO; LOPEZ; LEMA, 1993; KOROLEVA, 1988; KWAK; PARK; KIM, 1996; MARSHALL, 1987), sendo as variações encontradas provavelmente advindas da origem da amostra, mas permanecendo dentro dos padrões do produto, como sugerido por GARROTE; ABRAHAM; ANTONI (2001).

De acordo com Farnworth e Mainville (2003), a lista de microorganismos nos grãos de kefir em diferentes partes do mundo não é muito extensa, porque espécies contaminantes provavelmente não sobreviveriam devido à produção de compostos antagonistas pela microbiota simbiótica do kefir.

Em contrapartida, nenhuma das cepas de leveduras encontradas em 8 grãos de kefir diferentes de origem Sul Africana foi identificada em grãos de Taiwan (WITTHUHN; SCHOWMAN; BRITZ, 2004). Essas diferenças

poderiam ser explicadas principalmente pelas diferentes origens dos grãos, mas também talvez pelos diferentes métodos de identificação utilizados.

Vários fatores influenciam a distribuição das espécies nos grãos de kefir, e o perfil dos micro-organismos do produto final não é necessariamente idêntico ao inicialmente encontrado nos grãos devido condições como pH e tipo de substratos disponíveis durante o processo de fermentação. Witthuhn, Schowman e Britz (2004) relatou que outras condições, como por exemplo embalagens também podem afetar a comunidade microbiana dos grãos de kefir.

As leveduras específicas do kefir exercem um papel fundamental na formação do sabor e aroma (GLAESER; HANGST; ZIEGLER, 1986), possuindo também a propriedade de estimular bactérias do ácido lático em aumentar a produção de exopolissacarídeos (CHEIRSILP; SHIMIZU; SHIOYA, 2003). As leveduras encontradas estão de acordo com as citadas na literatura, sendo que *Torulaspota delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram as mais citadas (ÂNGULO; LOPEZ; LEMA, 1993; FRANZETTI et al., 1998; SIMOVA et al., 2002). Entretanto, a levedura *Zygosaccharomyces fermentati*, foi pouco citada na literatura (WITTHUHN; SCHOWMAN; BRITZ, 2004).

4.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O Quadro 7 apresenta os perfis de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos testados dos lactobacilos encontrados no kefir.

Susceptibilidade a inibidores da síntese da parede celular. Com relação à amoxicilina, ampicilina e vancomicina, as linhagens testadas apresentaram uma sensibilidade variando de 40% a 60%. Já no caso da oxacilina, 80% das linhagens foram sensíveis, e todas foram sensíveis à ceftroxiona.

Susceptibilidade aos inibidores da síntese protéica. Uma sensibilidade de 60 a 70% foi encontrada somente para amicacina e eritromicina. Para todos os

outros foi encontrada uma elevada resistência (tetraciclina, gentamicina, clorafecnicol) Resultados similares foram encontrados por vários autores (CEBECI; GURAKAN, 2003; DANIELSEN; WIND, 2003; ROJO-BEZARES et al., 2006; TEUBER et al. 1999), más não para outros que obtiveram sensibilidade à tetraciclina (CHARTERIS et al., 1998a; DELGADO; FLÓREZ; MAYO, 2005; HAMILTON-MILLER; SHAH, 1998; VAY et al., 2007).

Quadro 7 Perfil de susceptibilidade (diâmetro de halo de inibição em milímetros) a antimicrobianos dos lactobacilos isolados de grãos de kefir

Amostras	Antimicrobianos										
	CTX	AMO	ANL	TET	AMP	VAN	OXA	GNT	CLO	ERI	AMK
<i>L. casei</i>	S	MS	MS	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>L. casei</i>	S	S	MS	R	R	S	S	R	R	R	R
<i>L. casei</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R
<i>L. casei</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>L. casei</i>	S	MS	MS	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>L. nagalei</i>	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>L. nagalei</i>	S	MS	MS	R	S	R	R	R	R	MS	S
<i>L. plantarum</i>	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R
<i>L. plantarum</i>	S	MS	R	R	S	R	S	R	R	S	MS
<i>L. satsunensis</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S

Legenda: CTX (ceftriaxona 30µg), AMO (amoxicilina 10µg), ANL (ácido nalidíxico 30µg), TET (tetraciclina 30µg), AMP (ampicilina 45µg), VAN (vancomicina 30µg), OXA (oxacilina 1µg), GNT (gentamicina 10µg), CLO (cloranfenicol 30µg), ERI (eritromicina 15µg), AMK (amicacina 30µg).

R: resistente; MS: moderadamente sensível; S: sensível.

Susceptibilidade aos inibidores da síntese de ácidos nucléicos. Desta classe utilizou-se apenas o ácido nalidíxico, sendo que quatro linhagens apresentaram sensibilidade.

O uso de antimicrobianos é a principal estratégia para a eliminação de alguns patógenos. Seu uso é rotineiro em humanos e animais com intuito terapêutico e profilático. Contudo, isto também favorece o aumento da resistência de bactérias a esses medicamentos. Assim, genes de resistência presentes no DNA bacteriano de algumas cepas podem ser transmitidos às bactérias comensais e estas, por sua vez, podem transferir horizontalmente para bactérias patogênicas presentes na microbiota intestinal do hospedeiro (HUMMEL et al., 2007; ROJO-BEZARES et al., 2006; TEUBER et al., 1999). A utilização de alimentos contendo micro-organismos probióticos, como o kefir, tem sido pesquisada como alternativas ao uso de antibióticos, desde que eles não apresente esse tipo de resistência. A resistência aos antibióticos das espécies de *Lactobacillus* tem recebido pouca atenção. Isto reflete seu status como bactérias não patogênicas, comensais que desfrutam de uma reputação de longa data como promotores da saúde no trato gastrointestinal humano e trato urogenital feminino. No entanto, este status vem sendo reavaliado recentemente com a observação que tais bactérias podem estar associadas, ainda que raramente, com infecções na presença de certos fatores predisponentes (CHARTERIS, 1998a). Contudo, vários trabalhos têm relatado que neles a resistência a antibióticos pode ser intrínseca e não transmissível. Apesar disto, a ocorrência de resistência atípica e indesejável de uma minoria de *Lactobacillus* a certos antibióticos demonstra que nem todas as linhagens seriam adequadas para uso como probiótico ou agentes bioterapêuticos (CHARTERIS, 1998b). Em contrapartida, a resistência natural de *Lactobacillus* a um amplo número de antibióticos clinicamente importantes (desde que dificilmente transmissível) pode permitir o desenvolvimento de terapias de combinação antibiótico/probiótico para

condições como diarreia, infecção do trato urogenital feminino e endocardite infecciosa (CHARTERIS, 1998a)

No caso da vancomicina os resultados são semelhantes aos encontrados por alguns autores que demonstraram que a resistência à vancomicina é bastante disseminada entre lactobacilos (HOLLIMAN; BONE, 1988; NICAS et al., 1989; RUOFF et al., 1988).

Estes dados diferem dos encontrados por Teuber et al. (1999) que demonstraram que a resistência a eritromicina é relativamente usual em lactobacilos, e ligada à presença de plasmídeos, conforme verificado por Hummel et al. (2007), que detectaram a presença de gene de resistência a eritromicina em *Lactobacillus salivarius*.

Rodrigues et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana do kefir e seu polissacarídeo insolúvel, kefiran, em relação a várias espécies de bactérias. Como resultado, o kefir e o kefiran apresentam atividade contra todos os micro-organismos testados. Os valores médios encontrados das zonas de inibição do kefir e do kefiran foram iguais a 28,0 +- 2,0mm e 26,3 +- 2,1mm, respectivamente.

4.4 Teste de antagonismo *in vitro*

Os testes de antagonismo *in vitro* (Tabela 2), realizados em triplicata, demonstraram a produção de substâncias antagonistas por quase todos os isolados de lactobacilos contra *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi observada uma exceção com a linhagem de número sete de *Lactobacillus nagelei*, que inibiu apenas *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhum isolado inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Utilizando como probiótico a cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La-5, Pereira e Gómez (2007) conseguiram inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, num teste semelhante ao utilizado no presente trabalho. De acordo com este estudo a atividade inibidora é provavelmente decorrente de baixo pH e principalmente, da ação do ácido láctico, obtidos a partir do crescimento das bactérias lácticas.

Porém os resultados *in vitro* não permitem concluir a efetividade do antagonismo *in vivo*, e dessa maneira vê-se a necessidade da avaliação da interação das substâncias inibitórias com os componentes dos alimentos e a potencialização ou não, de seus efeitos por outros antimicrobianos de alimentos, sendo necessários então estudos futuros.

A atividade antimicrobiana do kefir tem sido bem documentada e demonstrou atividade contra vários micro-organismos, incluindo *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (COCONNIER et al., 1998; HUDAULT et al., 1997; SALOFF-COSTE, 1998b; VAN WYK; BRITZ; MYBURGH, 2002). Contudo, outros fatores podem estar relacionados com estas propriedades como a competição por adesão com enteropatógenos em células epiteliais.

Tabela 2 Perfil de antagonismo (diâmetro de halo de inibição em milímetros) a linhagens de referência de micro-organismos isolados do kefir produtores de ácido láctico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. Typhimurium</i>	40,7	44,3	36,0	36,4	42,2	41,1	-	43,6	37,0	38,1
<i>S. aureus</i>	32,1	24,1	47,4	36,5	33,7	29,5	-	40,9	39,4	46,0
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	40,1	32,6	31,4	26,7	51,4	41,5	12,8	32,5	37,6	37,9
<i>B. cereus</i>	41,7	29,7	43,7	38,5	39,2	51,1	-	41,3	17,8	26,1
<i>P. aeruginosa</i>	80,5	73,5	70,0	51,5	64,3	79,3	56,9	73,8	41,9	43,8

Legenda: 1- *Lactobacillus satsunensis*, 2- *Lactobacillus casei*, 3- *Lactobacillus casei*, 4- *Lactobacillus plantarum*, 5- *Lactobacillus plantarum*, 6- *Lactobacillus casei*, 7- *Lactobacillus nagalei*, 8- *Lactobacillus casei*, 9- *Lactobacillus casei*, 10- *Lactobacillus nagalei*.

4.5 Translocação bacteriana

De acordo com os dados da Tabela 3, a translocação bacteriana ocorreu em maior proporção no fígado e baço de animais que não receberam kefir ($P < 0,05$). Em 100% dos camundongos sem uso de kefir ocorreu a translocação bacteriana tanto para o fígado como para o baço quando os mesmos foram desafiados com uma suspensão de *Salmonella* Typhimurium. Em contrapartida, em apenas 50% dos camundongos tratados com kefir ocorreu a translocação para fígado e baço quando submetidos ao mesmo desafio (como esperado, os mesmos camundongos apresentaram translocação simultaneamente nos dois órgãos). Pode-se observar também que, quando houve translocação, os níveis de *Salmonella* Typhimurium foram em média menores nos órgãos de camundongos tratados com kefir quando comparados com os animais controle, tanto no fígado como no baço ($P < 0,05$).

Tabela 3 Frequência (número de animais apresentando translocação no órgão/número total de animais analisados) e nível (log UFC/g de órgão \pm SD) de translocação de *Salmonella* Typhimurium para o fígado e baço de camundongos tratados ou não com kefir antes do desafio patogênico

Órgão	Controle	Kefir
Fígado	8/8 6,90 \pm 0,93 ^a	4/8 2,36 \pm 0,84 ^b
Baço	8/8 6,34 \pm 1,21 ^a	4/8 1,92 \pm 0,42 ^b

^{a,b}Letras diferentes indicam valores com diferença estatisticamente significativas entre os dados na mesma linha ($P < 0,05$) pelo teste t de Student.

A microbiota intestinal possui, em condições normais, inúmeras espécies de bactérias, sendo a maioria anaeróbias estritas (LEE et al., 1999). A microbiota intestinal autóctone exerce efeitos pronunciados sobre uma série de reações bioquímicas, desenvolvimento anatômico, fisiológico e imunológico do

hospedeiro. Ao mesmo tempo, mantida em equilíbrio, impede que micro-organismos potencialmente patogênicos existentes nela prevaleçam ou se instale. Quando em desequilíbrio, deixa ocorrer a proliferação de patógenos oportunistas, causando infecções sistêmicas em hospedeiros debilitados (ZIEMER; GIBSON, 1998). Estudos têm demonstrado que o uso de probióticos é efetivo na manutenção da microbiota equilibrada e também na diminuição da translocação bacteriana (DUFFY, 2000; LEE et al., 2000; MATTAR et al., 2001; URAO et al., 1999).

De acordo com Peran et al. (2006) *Lactobacillus fermentum*, utilizados em vários estudos experimentais, apresenta atividade antioxidante marcada e tropismo com a mucosa intestinal, o que de acordo com é o ponto chave para a prevenção da passagem de bactérias patogênicas através da parede intestinal. Já para Karen et al. (2010) a diminuição da translocação bacteriana por próbióticos se deve a redução de bactérias patogênicas no lúmen intestinal que tem efeitos favoráveis na função da barreira da mucosa duodenal.

As bactérias classificadas como patógenos intracelulares, como por exemplo, espécies de *Salmonella*, tendem a translocar mais rapidamente. Entre os micro-organismos patogênicos, ela é considerada uma das principais causas de infecções gastrointestinais em humanos, que estão classificadas entre os principais problemas de saúde pública em vários países, desenvolvidos ou não. No presente trabalho, colônias típicas de *Salmonella* Typhimurium foram recuperadas de amostras diluídas do fígado e baço de todos os animais controles desafiados com a bactéria. Estes resultados confirmam a ocorrência de invasão por *Salmonella* caracterizada por colonização do fígado e baço, conforme relatado por Stefanova et al. (2007). Por outro lado, os resultados deste trabalho demonstraram uma diminuição significativa da frequência como do nível de translocação bacteriana por *S. Typhimurium*, nos animais que receberam tratamento com kefir, tanto para o fígado quanto para o baço.

Os resultados obtidos em outros estudos de translocação bacteriana, com a utilização de modelos animais desafiados com *Salmonella* após tratamento supostamente profilático, são variáveis. Bovee-Oudenhoven et al. (2003) administraram 10^9 células mL^{-1} de *S. enteritidis*, em ratos, e observaram aumento significativo da translocação bacteriana para o fígado, baço e MLNs, mesmo após tratamento prévio dos animais com frutooligossacarídeos.

Stefanova et al. (2007), por outro lado, observaram efeito protetor profilático da administração oral de cumarina, em camundongos desafiados intraperitonealmente com *S. Typhimurium*. Estes autores verificaram uma redução da contagem bacteriana de *Salmonella* no fígado e baço dos animais desafiados previamente tratados com a substância. Contudo, esses últimos resultados foram obtidos com uma via de inoculação que pode ser considerada como não natural, já que a salmonelose é adquirido por via oral. Apesar dessa limitação, os dados são compatíveis com de outros autores como Zareie et al. (2006), que demonstraram que a utilização de probióticos eliminou a translocação bacteriana para os nódulos linfáticos mesentéricos em ratos submetidos a estresse crônico da mucosa intestinal, ou com os dados encontrados por Martins et al. (2007) onde a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reduziu os níveis de translocação bacteriana da *Salmonella Typhimurium* para os nódulos mesentéricos linfáticos, placas de Peyer, fígado e baço. Os dados vêm confirmar o uso potencial de agentes probióticos como redutores ou inibidores da translocação bacteriana. Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de avaliar o mecanismo de ação desses agentes e a resposta em seres humanos (HEREK; KARA; KALELI, 2004; LUYER et al., 2005; MARTINS et al., 2007).

4.6 Determinação de IgA

A Figura 2 apresenta os dados de determinação da concentração em IgA no fluido intestinal de camundongos tratados ou não com kefir. Essa concentração foi maior nos animais que receberam o kefir quando comparados com os animais do grupo controle ($P < 0,05$). Pizarro (2005) também obteve diferenças significativas na produção de IgA total entre frangos tratados ou não com próbióticos compostos pelos gêneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* quando desafiados com *Salmonella Typhimurium*.

De acordo com Rodrigues et al. (2000), um importante mecanismo de ação do probiótico na modulação da resposta imune é o aumento da produção de IgA, a fim de impedir a adesão das bactérias presentes no lúmen à mucosa intestinal, o que é importante para conter uma possível translocação do micro-organismo patogênico.

Esta ação imunomoduladora também foi demonstrada por Perdigón et al. (1999) em que linhagens de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* interagiram com células da placa de Peyer para levar a um aumento de concentrações de IgA, além de células CD4 e anticorpos específicos para a cepa estimulada

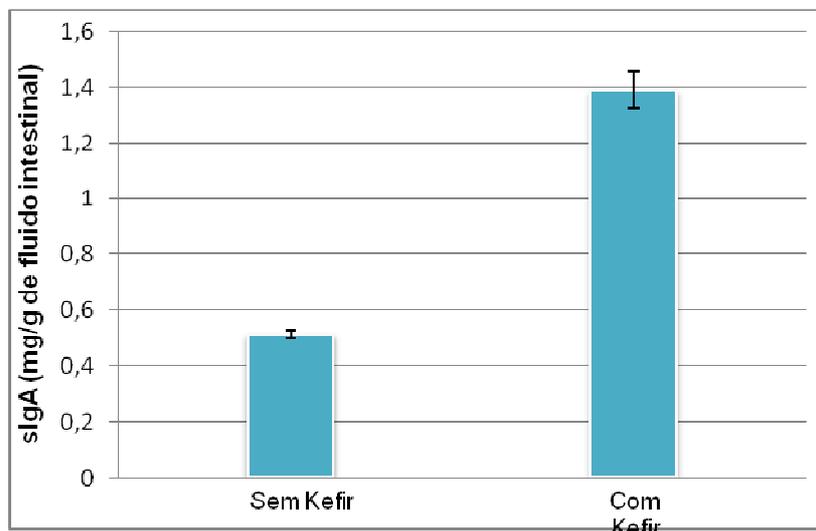


Figura 2 Concentração em IgA total no fluido intestinal de camundongos tratados ou não tratados com kefir.

4.7 Determinação de INF- γ

A Figura 3 apresenta os dados de determinação da concentração em INF- γ no soro intestinal de camundongos tratados ou não com kefir. Essa concentração foi maior nos animais controle quando comparados com aqueles que receberam o kefir ($P < 0.05$).

Evidências de benefícios imunológicos de bactérias do gênero *Lactobacillus* utilizados como probióticos foram observadas por Gorbach (2000) em que *Lactobacillus* GG estimula a liberação local de interferon e isso facilita o transporte de antígeno subjacente as células linfoides o que aumenta a captação destes antígenos nas placas de Peyer.

Administração de probióticos elaborado com leveduras favoreceu a resposta imune celular tipos 1 e 2 estimulando a produção de INF- γ , em camundongos (RODRIGUES et al., 2000). Coppola e Turnes (2004)

comprovaram que *S.boulardii* aumentou a resposta imune humoral em camundongos desafiados por *E. coli*.

De acordo com Morais e Jacob (2006), efeitos imunológicos dos probióticos, como a diminuição da secreção de INF- γ , tem sido observado, principalmente em pacientes com alergia a leite de vaca e dermatite atópica.

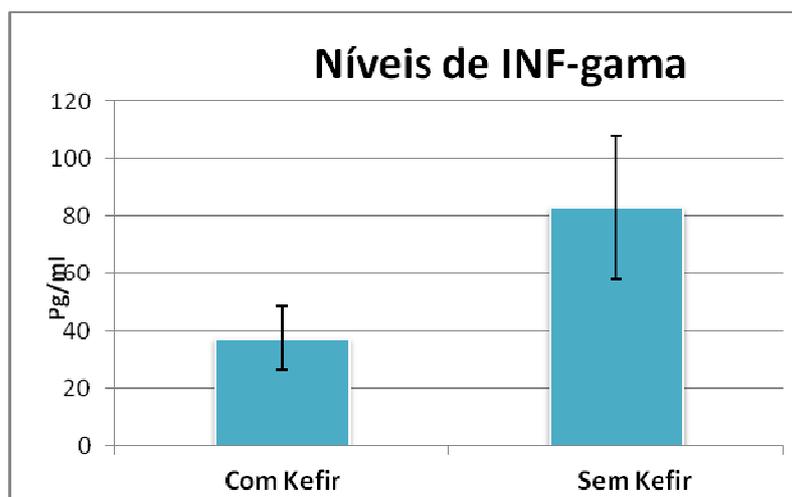


Figura 3 Concentração em INF- γ no soro de camundongos tratados ou não com kefir e desafiados com Salmonela

4.8 Determinação de IL-10

A Figura 4 apresenta os dados de determinação da concentração em IL-10 no soro de camundongos tratados ou não com kefir. Essa concentração foi menor nos animais controle quando comparados com aqueles que receberam o kefir ($P < 0,05$).

A IL-10 é uma citocina produzida principalmente por monócitos e, em menor quantidade pelos linfócitos, apresentando efeitos sobre imunorregulação, levando a diminuição da inflamação.

Em estudos *in vitro*, Imaoka et al. (2008) relataram aumento na produção de IL-10 a partir do tratamento com probiótico em modelos de colite, o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo para essa citocina, indicando que o kefir pode atuar na modulação da resposta imunológica.

Leblanc et al. (2006) observaram a atividade imunoreguladora do kefir em estudos anticarcinogênicos, em que a bebida láctea fermentada e sua fração protéica aumentaram os níveis séricos de IL-10 e diminuíram os níveis de IL-6 em glândulas mamárias de camundongos Balb-c e dessa maneira concluíram que esse tratamento foi capaz de retardar o crescimento do tumor.

Generoso et al. (2010) e Li et al. (2009) também obtiveram resultados semelhantes, observando aumento da produção desta interleucina, porém os estudos utilizaram leveduras viáveis e não viáveis como probiótico, concluindo assim que ação imunoregulatória independe da viabilidade.

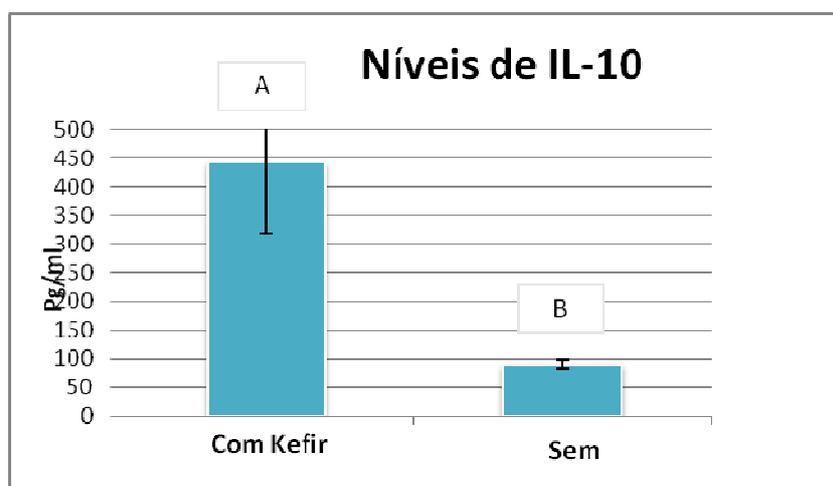


Figura 4 Concentração em IL-10 no soro de camundongos tratados ou não com kefir

4.9 Histopatologia

Foram observadas diferenças quanto aos aspectos histopatológicos do fígado e do intestino entre os grupos tratados ou não (controle) com kefir e desfiados com salmonela. O aspecto de ambos os órgãos estava mais preservado nos animais tratados comparativamente aos grupos não tratados (Figuras 5 e 6). Para os padrões observados no fígado, o grupo controle infectado com *Salmonella* Typhimurium apresentou grandes áreas irregulares sem limites definidos, e de localização também irregular nos lóbulos hepáticos com infiltrado inflamatório exuberantes (Figura 5). O grupo tratado com kefir e infectado apresentou tecidos bastante preservados, observando-se apenas raramente e em alguns animais a presença de alguns pequenos focos de infiltrado, o que caracteriza grau de proteção significativo em relação aos animais controle..

Os intestinos do grupo controle mostraram alterações reativas do epitélio de superfície, com edema da submucosa (descontinuidade da borda em escova, Figura 5 A - D), aumento do número de linfócitos epiteliais e menor número de células caliciformes contendo muco (Figura 5 C). Observou-se ainda alargamento e irregularidade na espessura e altura das vilosidades, que, no entanto não apresentam ulcerações ou atrofia importante (Figura 5 C). No grupo tratado com kefir, houve redução do edema da lamina própria, melhor preservação da borda em escova do epitélio de superfície e alterações reativas muito discretas, sem aumento da celularidade da lamina própria, indicando pelo menos em algumas áreas e alguns animais, melhor preservação da mucosa nestes animais.

Geyik et al. (2006) obtiveram resultados parecidos ao tratar ratos com obstrução da alça intestinal com o probiótico *Saccharomyces boulardii*, onde ao

analisarem os intestinos, observaram maior altura das vilosidades nos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Já Okamoto, Andreatti e Lima (2009) não observaram diferenças significativas na capacidade de regeneração de vilosidades intestinais entre grupos de pintos tratados e não tratados com *Lactobacillus* spp. ao serem desafiados com *Salmonella* Enteritidis, demonstrando que a adição dessas bactérias à ração não afeta o tamanho da vilosidade.

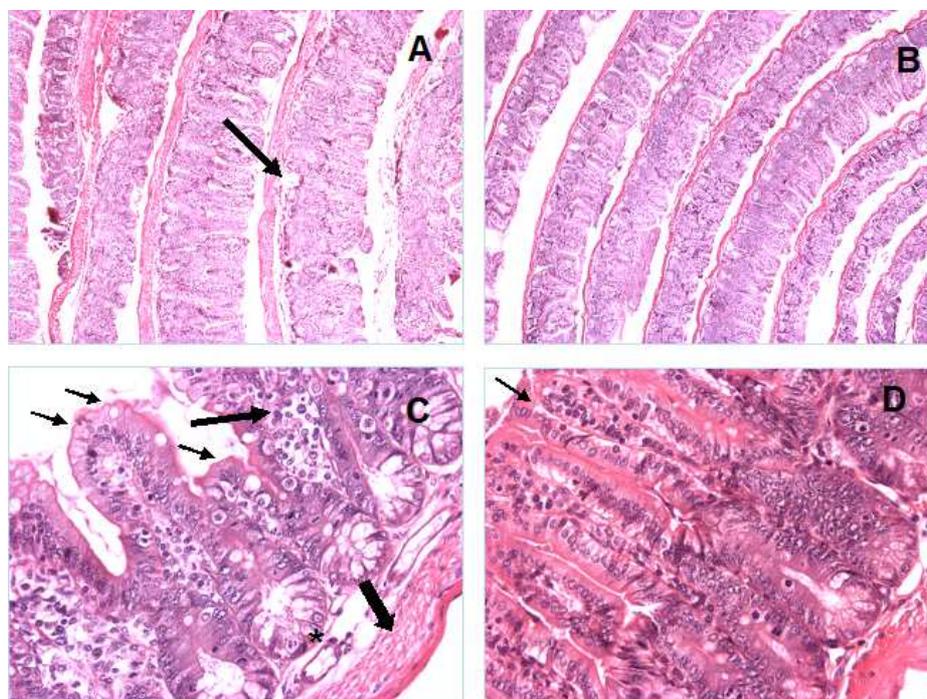


Figura 5 Aspecto histopatológico do intestino ileodistal de animais tratados ou não com kefir e desafiados com *Salmonella* Typhimurium. O intestino dos animais controle (A e C) apresentou edema da lamina própria (seta média) e das camadas musculares (C, seta grossa). Observou-se ainda interrupção da borda em escova e irregularidade da altura e largura das vilosidades (C, setas finas). Os vasos da lamina própria apresentaram-se ectásicos e com frequentes figuras de adesão intravascular (C, *). Os animais tratados com kefir apresentaram-se preservados em relação a estes parâmetros (B e D)

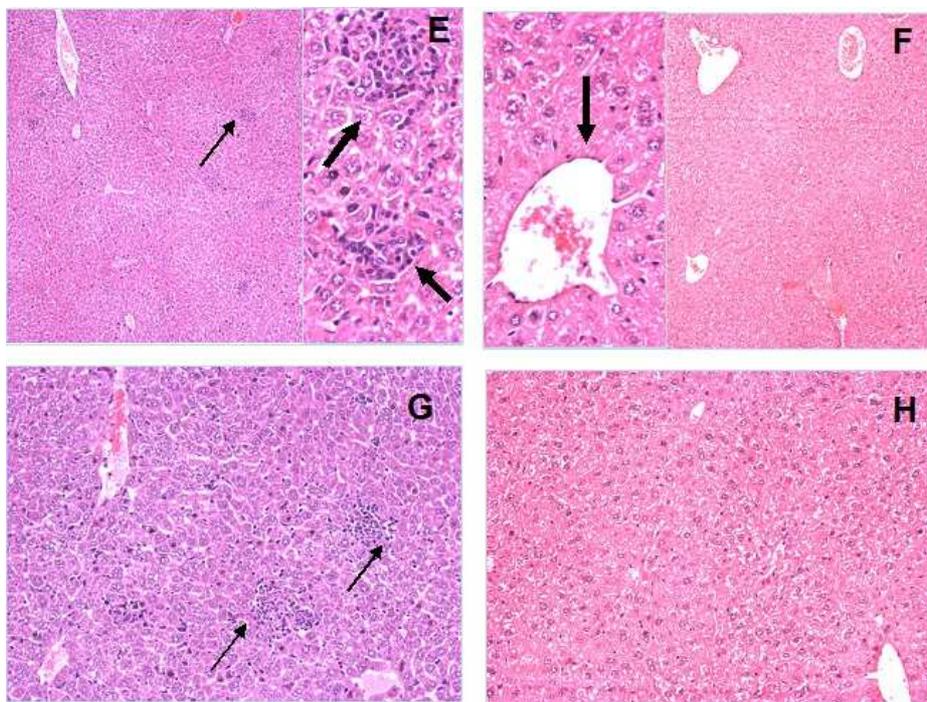


Figura 6 Aspecto histopatológico do fígado de animais tratados ou não com kefir e desafiados com *Salmonella* Typhimurium. O fígado dos animais controles apresentou infiltrado difuso (E, setas) de padrão misto, associado com alterações degenerativas dos hepatocitos (setas E e setas G). No fígado dos animais tratados com kefir houve preservação total da arquitetura lobular (F, seta indicando veia central do lóbulo hepático) e ausência de sinais degenerativos e inflamatórios significativos (F e H)

5 CONCLUSÃO

- a) No kefir estudado, foram isoladas 10 linhagens pertencentes a 4 espécies diferentes do gênero *Lactobacillus* e três espécies de leveduras.
- b) A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos mostrou que todos os isolados foram sensíveis à ceftriaxona e resistentes à tetraciclina e cloranfenicol.
- c) A avaliação do antagonismo *in vitro* mostrou a produção de substâncias antagonistas por quase todos os isolados contra todos os indicadores, exceto *Listeria monocytogenes*.
- d) Em camundongos tratados com o kefir durante dez dias, a determinação de IgA no fluido do intestino delgado mostrou uma concentração do que no grupo não tratado
- e) A determinação de INF- γ e IL-10 no soro dos animais mostrou uma concentração menor da primeira citocina e maior de segunda nos camundongos tratados com o kefir durante dez dias quando comparados com o grupo não tratado.
- f) Quando desfiados por via oral com *S. Typhimurium*, uma TB ocorreu em menor proporção no fígado e baço do grupo de animais tratados com kefir quando comparados com o grupo não tratado. Isto foi confirmado pelo exame histopatológico que evidenciou danos mais graves nos intestinos e fígado dos animais do grupo não tratado.

Concluindo, o kefir estudado no presente trabalho mostrou conter várias espécies de *Lactobacillus* e de leveduras que poderiam ser responsáveis por um

efeito protetor quando o kefir é utilizado para pretratar animais posteriormente desafiados com *S. Typhimurium*.

REFERÊNCIAS

ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, p. 346-352, 1982.

ANDERSEN, M. H. et al. Cytotoxic T cells. **Journal of Investigate Dermatology**, Baltimore, v. 126, p. 32-41, 2006.

ÂNGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the galacian region (North West Spain). **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 60, p. 263-267, 1993.

ANSELMO, R. J.; VITORIA, S. S.; LAUSADA, L. I. Effect bacteriocide of kefir on *Salmonella* spp. **Informacion Tecnologica**, La Serena, v. 12, p. 91-95, 2001.

ANTUNES, A. E. C. et al. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 83-90, 2007.

ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Washington: ILSI, 2002. p. 45.

BARBOSA, F. H. F.; BAMBIRRA, F. H. S.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação in vitro, ex vivo e in vivo em camundongos gnotoxênicos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, p. 1-8, 2006

BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 3, p. 139-154, 1995.

BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 23, p. 403-411, 1979.

BOHMLER, G. et al. The epidemiology of helicobacteriosis in humans; studies of the survival capacity of the microbe in food. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 103, p.438-43, 1996.

BOLLINGER, R. R. et al. Human secretory immunoglobulin A contributes to biofilm formation in the gut. **Immunology**, Oxford, v. 109, p. 580-587, 2003.

BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for then protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent intestine”, held in Paris, June 14, 2002. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 78, p. 675-683, 2003.

BOVEE-LOUDENHOEN, I. M. J. et al. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonization but stimulate translocation of salmonella in rats. **Gut**, London, v. 52, p. 1572-1578, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução nº. 5 de 13 de novembro de 2000**. O ficializar os “Padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados”. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar &id=3285>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº. 5 de 13 de novembro de 2007. Padrão de Identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 14 nov. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 14 maio 1999a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portaris/15_99.htm>. Acesso em: 11 maio 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 3 dez. 1999b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portaris/18_99.htm>. Acesso em: 11 maio 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 dez. 1999c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portaris/119_99.htm>. Acesso em: 11 maio 2013.

CARPUSO, L.; FAVE, G. D.; MORELLI, L. Probiotics, prebiotics, and new foods. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 42, p. 155, 2008. Suppl.

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 139, p. 1189-1203, 1974.

CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, London, v. 20, p. 511-518, 2003.

CHARTERIS, W. P. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic lactobacillus species. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 1636-1643, 1998a.

CHARTERIS, W. P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal Dairy Technology**, Huntingdon, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998b.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranoformis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 100, p. 43-53, 2003.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 492-501, 2008.

COCONNIER, M. H. et al. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4573-4580, 1998.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, Essex, v. 40, p. 951-956, 2007.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 1-11, Apr. 2003.

DEITCH, E. A. et al. Obstrutive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. **American Journal of Surgery**, New York, v. 159, p. 79-84, 1990.

DELGADO, S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. **Current Microbiology**, New York, v. 50, p. 200-207, 2005.

DE VRESE, M. et al. Probiotics: compensation for lactase insufficiency. **America Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 421-429, 2001. Suppl.

DE VRESE, M.; KELLER, B.; BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **The British Journal of Nutrition**, London, v. 67, p. 67-75, 1992.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 108, p. 510-521, 2008.

DUFFY, L. C. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 432-436, 2000. Suppl.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 1191-1200, 2001.

EVERETT, M. L. et al. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial infections in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, New York, v. 4, p. 321-332, 2004.

FAGARASAN, S.; HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, p. 63-72, 2002.

FARNWORTH, E. R. Kefir: a complex probiotic. **Food Science e Technology**, Quebec, v. 2, p. 1-17, 2005.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: a fermented milk product: handbook of fermented. **Journal of Functional Foods**, St John's, v. 4, p. 77-111, 2003.

FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. **Current Opinion Gastroenterology**, Philadelphia, v. 20, p. 146-155, 2004.

FERREIRA, C. S. A. **Detecção de imunoglobulinas séricas a proteínas de *Salmolella enterica* sorotipo Enteritidis em aves infectadas experimentalmente**. 2001. 85 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

FLOCH, M. H.; MONTROSE, D. C. Use of probiotics in humans: an analysis of the literature. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 34, p. 547-570, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working group report on drafting guidelines for the evolution of probiotics in food**. London, 2002.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, London, v. 88, p. 39-49, 2002. Suppl.

FORESTIER, C. et al. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence of intestinal cells and antimicrobial properties. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 167-173. 2001.

FRANZETTI, L. et al. Microbiological and chemical investigations on "Sugar Kefir" drink. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 48, p. 67-80, 1998.

FULLER, K. G.; JAINE-WILLIAMS, D. J. Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora: clearance of translocated intestinal bacteria. **Research in Veterinary Science**, London, v. 11, p. 368-374, 1970.

FURUKAWA, N. et al. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing meth-A. **Animal Science Technology**, Amsterdam, v. 62, p. 579-585, 1991.

FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; YAMANAKA, Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. **Japanese Society of Nutrition and Food Science**, Tokyo, v. 43, p. 450-453, 1990.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, p. 639-652, 2001.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Inhibitory power of kefir. The role of organic acids. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 364-369, 2000.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Berlin, v. 30, p. 77-84, 1997.

GENEROSO, S. V. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 192, p. 477-484, 2010.

GEYIK, M. F. et al. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstruction jaundice. **Annual Review of Surgery**, Bethesda, v. 88, p. 178-180, 2006.

GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgraduate Medical Journal**, Basingstoke, v. 7, p. 1-12, 2004.

GLAESER, H.; HANGST, E.; ZIEGLER, K. Biochemische Charakterisierung der in Molkereikefir und Kefirkulturen vorkommende Hefen. **Deutsche Molkerei-Zeitung**, Kempten, v. 16, p. 483-490, 1986.

GONCHAROVA, G. I. et al. Effects of different types of feeds for newborn infants on intestinal microbiocenosis. **Voprosy Pitaniia**, Moscow, v. 6, p. 49-53, 1979.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 95, p. 2-4, Jan. 2000. Suppl.

GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 58, p. 25-29, 2005.

HAMADA, H. et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **Journal of Immunology**, Oxford, v. 168, p. 57-64, 2002.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; SHAH, S. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 153-154, 1998.

HEREK, O.; KARA, I.G.; KALELI, I. Effect of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury. **Surgery Today**, Tokyo, v. 34, p. 256-260, 2004.

HOLLIMAN, R.E.; BONE, G.P. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. **Journal of Infection**, London, v. 16, p. 279-283, 1988.

HUANG, J. S. et al. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 47, p. 2625-2634, 2002.

HUDAULT, S. et al. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 513-518, 1997.

HUMMEL, A. S. et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 730-739, 2007.

IMAOKA, A. et al. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 16, p. 2511-2516, 2008.

ISOLAURI, E. et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, Evaston, v. 88, p. 90-97, 1991.

ISOLAURI, E. et al. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, p. 444-450, 2001. (Suppl.).

ISOLAURI, E.; SALMINEN, E.; SALMINEN, S. Lactic acid bacteria and immune modulation In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. New York: M. Dekker, 1998. p. 255-268.

JIANZHONG, Z. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 770-775, 2009.

KABADJOVA, P. et al. Differentiation of closely related Carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5358-5366, 2002.

KAILA, M. et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatric Research**, New York, v. 32, n. 141, 1992.

KAREN, M. et al. Probiotic agent *Saccharomyces boulardii* reduces the incidence of lung injury in acute necrotizing pancreatitis induced rats. **The Journal of Surgical Research**, New York, v. 160, p. 139-144, 2010.

KATARIA, J. et al. "Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial?" **Nutrition Reviews**, New York, v. 67, n. 9, p. 546-550, 2009.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, Cambridge, v.16, p. 29-36, 1994.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 15, p. 1-9, 2002.

KEMPKA, A. P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 170-177, 2008.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, p. 329-347, 2008.

KOO, F. C. W. et al. Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 43, p. 93-100, 1984.

KOROLEVA, N. S. Technology of Kefir and kumys. **IDF Bulletin**, London, v. 227, p. 96-100, 1988.

KUBO, M.; ODANI, T.; NAKAMURA, S. Pharmacological study on kefir: a fermented milk product in Caucasus. I. on antitumor activity. **Yakugaku zsshi**, Tokyo, v. 112, p. 489-495, 1992.

KURTZMAN. C. P.; FELL. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 937-942, 1996.

KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on currently regulatory terminology. **Food Control**, Vurrey, v. 12, p. 109-117, 2001.

LACHANCE, M. A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 172-177, 1999.

LEBLANC, A. M. et al. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. **Cytokine**, New York, v. 34, p. 1-8, 2006.

LEE, D. J. et al. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. **Pediatric Surgery International**, Berlin, v. 16, p. 237-242, 2000.

LEE, M. H. et al. antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 270-275, 2006.

LEE, Y. K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: J. Wiley, 1999. 211 p.

LEVY, J. Imunonutrition: the pediatric experience. **Nutrition**, London, v. 14, p. 641-647, 1998.

LICHTMAN, S. M. Bacterial translocation in humans. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 33, p.1-10, 2001.

LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington, v. 147, p. 747-748, 1965.
LI, N. et al. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus GG*: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 66, p. 203-7, 2009.

LINK-AMSTER, H. et al. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 55-63, 1994.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 53, p. 2467-2474, 2005.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, p. 104-108, 2006.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 27, p. 93-103, 2008.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 23, p. 67-74, 2006.

LUYER, M. D. et al. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, p. 3686-3692, 2005.

MAC PHERSON, A. et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, Washington, v. 288, p. 2222-2226, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004.

MAEJIMA, K.; DEITCH, E. A.; BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. **Infection and Immunity**, Washington, v. 43, p. 6-10, 1984.

MAIA, O. B. et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 79, p. 183-189, 2001.

MAINVILLE, I. et al. Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 45-49, 2001.

MAJAMAA, H. et al. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Jerusalém, v. 20, p. 333-338, 1995.

MAKELA, P. H.; VOLTONEV, V. V.; VOLTONEM, M. The role of O antigen (lipopolysaccharide) factors in the virulence of *Salmonella*. **Journal of Infection Disease**, Berlin, v. 128, p. 81-85, 1973.

MARQUINA, D. et al. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 136, 2002.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observation on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 57, p. 491-497, 1984.

MARSHALL, V. M. Fermented milks and their future trends: microbiological aspects. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 52, p. 559-574, 1987.

MARTINS, F. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, p. 352-359, 2007.

MARTINS, F. S. et al. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, João Pessoa, v. 5, p. 1-13, 2005.

MATTAR, A. F. et al. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, Berlin, v. 17, p. 265-268, 2001.

MICHELI, L. et al. Isolation and characterization of ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefirian. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 69-74, 1999.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, p. 109-122, 2006.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal da Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 190-197, 2006.

MOREIRA, J. L. S. et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, London, v. 5, p. 1-9, 2005.

MULLER, C.; MAC PHERSON, A. J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. **Gut**, London, v. 55, p. 276-284, 2006.

MURIFUSHI, M.; MIZUGUCHI, J.; AIBARA, K. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 12, p. 29-35, 1986.

MUTLU, E. A.; FARHADI, A.; KESHAVARZIAN, A. New developments in the treatment of inflammatory bowel disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 11, p. 365-385, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**. 7. ed. Villanova, 2007.

NEWBERRY, R. D.; LORENZ, R. G. Organizing a mucosal defense. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 206, p. 6-21, 2005.

NICAS, T. I. et al. Activity of glycopeptides against vancomycin resistant Gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 33, p. 1477-1481, 1989.

NICOLI, J. R. et al. Probióticos: experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA C. L. L. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 123-133.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 28, n. 163, p. 34-38, 2000.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos y simbióticos: moduladores del sistema digestivo. **Ciencia Hoy**, Buenos Aires, v. 13, n. 75, p. 39-43, 2003.

NINANE, V.; MUKANDAYAMBAGE, R.; BERBEN, G. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environmente**, Cambridge, v. 13, p. 459-466, 2009.

NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 100, p. 583-592, 2005.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI, R. L.; LIMA, E. T. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, p. 568-573, 2009.

OLIVEIRA, M. A. et al. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. **Nutrition**, London, v. 22, p. 419-24, 2006.

OLIVEIRA, R. B. S. **Análise microbiológica do kefir em grão, suspensão, liofilizado e adicionado a ração de coelhos**. 2003. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade de Alfenas, Alfenas, 2003.

OPPENHEIM, J. J. Cytokines: past, present and future. **International Journal of Hematology**, Limerick, v. 74, p. 3-8, 2001.

ORLOVA, Z. N.; KASATKINA, T. N.; OKHAPKINA, V. F. Use of Robolact and Linolac dry milk mixtures in the overall therapy of infants with acute intestinal infections. **Voprosy Pitaniia**, Moscow, v. 4, p. 45-47, 1980.

ORMISSON, A. A.; SOO, T. R. Effect of lactic-acid milk and kefir on the indicators of acid-base equilibrium of arterial blood in healthy young children and patients with acute pneumonia and bronchitis. **Pediatrics**, Napoli, v. 10, p. 37-38, 1976.

OTES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 2, p. 54-59, 2003.

OUWEHAND, A. C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid: bacteria: microbiology and functional aspects**. New York: M. Dekker, 1998. p. 139-159.

PERAN, L. et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. **International Journal of Colorectal Disease**, Berlin, v. 21, p. 737-746, 2006.

PERDIGÓN, G. et al. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacterial. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1108-1114, 1999.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PIDOUX, M. et al. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 69, p. 311-20, 1990.

PIZARRO, L. D. C. R. **Estudos da resposta imune e da colonização e invasão por *Salmonella entérica subsp entérica* sorotipo *Typhimurium* Na^r, em frangos de corte, tratados com glucano, probiótico e produtos de exclusão competitiva**. 2005. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

POOL-ZOBEL, B. L.; MUNZNER, R.; HOLZAPFEL, W. H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 20, p. 261-270, 1993a.

REIF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 300, p. 25-33, 2010.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, D.E. Probiotics and commensals reverse TNF- α and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 130, p.731-746, 2006.

RODRIGUES, A. C. P. et al. *Saccharomyces boulardii* induces the production of type 1 and type 2 cytokines in gnotobiotic mice. In : THE PROSPECTS OF PROBIOTICS AND THERAPY OF DISEASES OF YOUNG, 1., 2000, High Tatras. **Proceedings...** High Tatras: Institute of Veterinary Medicine, Kosice, 2000a. p. 87

RODRIGUES, A. C. P. et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 404-414, 2000b.

RODRIGUES, K. L. et al., Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, p. 404-408, 2005.

ROJO-BEZARES, B. et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 234-240, 2006.

ROSSI, E. A. Alimentos funcionais. In: DÂMASO, A. (Coord.). **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 335-362.

ROY, D.; SIROIS, S.; VICENT, D. Molecular discrimination of lactobacilli used as started and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 282-289, 2001.

RUOFF, K. L. et al. Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 2064-2068, 1988.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, p. 1-16, 2006.

SALMAN, F. T. et al. The effect of surgical trauma on the bacterial translocation from the gut. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 27, p. 802-804, 1992.

SALOFF-COSTE, C. J. Kefir. **Dannone NewsLetter**, [S. l.], p. 11, 1998b.

SALOFF-COSTE, C. J. Probiotics. **Dannone NewsLetter**, [S. l.], p. 15, 1998a.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis**: a molecular approach. Washington: ASM, 1994.

SANTOS, A. et al. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p. 434-437, 2003.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage: a review. **British Journal of Nutrition**, London, v. 109, p. 280-290, 2007.

SASHINAMI, H.; YAMAMOTO, T.; NAKANE, A. The cytokine balance in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Cytokine**, New York, v. 25, p. 212-218, 2006.

SCHMIDT, P.; VASS, A.; SZAKALY, S. Effect of fermented milk diets on regeneration of the rat liver. **Acta Medica Hungarica**, Budapest, v. 41, p. 163-169, 1984.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. O Kefir e inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. (Org.). **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004. v. 1, p. 459-486.

SILVA, A. M. et al. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 29-37, 2004.

SILVA, K. R. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemical and Biotechnological**, Heidelberg, v. 152, p. 316-325, 2009.

SIMOVA, E. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 28, p. 1-6, 2002.

SIRÓ, I. et al. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance: a review. **Appetite**, London, v. 51, p. 456-467, 2008.

SPAHN, T. W.; KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: The role of lymphotoxin and GALT organs. **Gut**, London, v. 53, p. 456-465, 2004.

STEFANOVA, T. et al. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, p. 7-14, 2007.

STEFFEN, E. K.; BERG, R. D.; DEITH, E. A. A comparison of the translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 157, p. 1032-1037, 1988.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; LAINO, R. R. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Revista Saúde e Ambiente**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 16-20, Jan./Jun. 2008.

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 20, p. 313-319, 2002.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 40, p. 722-56, 1976.

TAMAI, Y. et al. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 81, p. 181-182, 1996.

TAMIME, A. Y. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensm-Wiss. U-technology**, London, v. 34, p. 251-261, 2001.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 56, p. 2-15, 2002. Suppl.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Reviews Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 107-138, 2002.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 76, p. 115-137, 1999.

THOREUX, K.; SCHMUCKER, D. L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. **Journal of Nutrition**, London, v. 131, p. 807-812, 2001.

TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from 16S–23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 49-56, 1997.

URAO, M. et al. Does probiotics administration decrease serum endotoxin levels in infants? **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 34, p. 273-276, 1999.

VAN WYK, J.; BRITZ, T. J.; MYBURGH, A. S. Arguments supporting kefir marketing to the low-income urban African population in South Africa. **Agrekon**, Glasgow, v. 41, p. 43-62, 2002.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 714-728, 2008.

VASS, A.; SZAKALY, S.; SCHMIDT, P. Experimental study of the nutritional biological characters of fermented milks. **Acta Medica Hungarica**, Budapest, v. 41, p. 157-161, 1984.

VAY, C. et al. Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant Gram-positive organisms. **Diagnostics Microbiology and Infectious Disease**, Berlin, v. 57, p. 183-188, 2007.

VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-láticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

WELLS, C. L. Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, p. 87-93, 1990.

WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v. 17, p. 397-425, 2003.

WIJBURG, O. L. C. et al. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 23, p. 21-26, 2006.

WITTHUHN, R. C.; SCHOWMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 57, p. 33-37, 2004.

WOLOCHOW, G.; HILDEBRAND, G. J.; LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 116, p. 523-528, 1996.

WOOF, J. M.; MESTECK, Y. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 206, p. 64-82, 2005.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 77-100.

ZACCONI, C. Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. **Microbiology Alimentation and Nutrition**, Paris, v. 12, p. 387-390, 1995.

ZAREIE, M. et al. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. **Gut**, London, v. 2, p. 1553-1560, 2006.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p. 473-479, 1998.

ZUBILLAGA, M. et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, New York, v. 21, p. 569-579, 2001.