

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CULTURA DE *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 SOBRE *Escherichia coli* – ESTUDO DO POTENCIAL PROBIÓTICO

Denise Patricia Lins de Azevedo

Recife – 2005

Denise Patricia Lins de Azevedo

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CULTURA DE
Saccharomyces cerevisiae UFPEDA 1015 SOBRE
Escherichia coli – ESTUDO DO POTENCIAL PROBIÓTICO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Prof^a Dr^a Eulália Camelo Pessoa de
Azevedo Ximenes

Recife - 2005

Azevedo, Denise Patricia Lins de
Atividade antagônica da cultura de
Saccharomyces cerevisiae UFPEDA 1015 sobre *Escherichia coli* – estudo do potencial probiótico /
Denise Patrícia Lins de Azevedo. – Recife : O Autor,
2005.

xiii, 52 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Produtos bioativos –
Microbiologia aplicada. 2. *Saccharomyces cerevisiae*
– Atividade antagônica sobre a *Escherichia coli* –
Co-cultura. 3. Potencial probiótico. I. Título.

579.6
579.562

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-122

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *DENISE PATRICIA LINS DE AZEVEDO* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

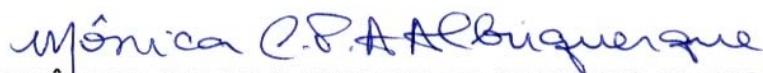
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 29 DE JULHO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dr^a. ANA MARIA SOUTO-MAIOR
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dr^a MÔNICA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE
Departamento de Medicina Tropical - UFPE

Eu me lembro! Eu me lembro! Era pequeno
E brincava na praia – o mar bramia

E erguendo o dorso altivo sacudia
A branca espuma para o céu sereno.

E eu disse a minha mãe nesse momento:
“Que dura orquestra! Que furor insano!
Que pode haver maior do que o oceano,
Ou que seja mais forte que o vento?”

Minha mãe a sorrir olhou pros céus
E respondeu: “Um Ser que nós não vemos.
É maior do que o mar, que nós tememos
Mais forte que o tufão! Meu filho, é DEUS!”

Casimiro de Abreu

A Pedro, Dilma, Dayse, Rômulo e Luísa pelo
que representam em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pela vida e por tudo que me proporcionou e me proporcionará.

A **ORIENTADORA**, Professora **Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**, pela confiança, orientação e amizade.

Aos **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, pelos ensinamentos, convívio e amizade.

A **MEUS PAIS e FAMILIARES**, pela confiança, incentivo e dedicação inesgotáveis.

Aos **AMIGOS**, conquistados na Universidade Federal de Alagoas e no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pelo incentivo e amizade.

Aos **COLEGAS DE CURSO**, por todos os momentos em que estivemos juntos.

Aos **COLEGAS DE LABORATÓRIO**, pelo convívio e amizade.

A **SECRETÁRIA DA PÓS-GRADUAÇÃO**, Maria Suely, pela amizade e dedicação.

Aos **FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**, pelo auxílio e amizade.

Ao **PESSOAL DA RECEPÇÃO**, pela colaboração.

A **CAPES**, pela concessão da Bolsa de Mestrado, proporcionando a realização de minha pós-graduação.

Enfim, **A TODOS** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1.0. INTRODUÇÃO	1
2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Gastreenterites	6
2.1.1. Microflora Gastrintestinal Humana	11
2.2. Probióticos	14
2.2.1. Mecanismos de Ação	17
2.3. O Gênero <i>Saccharomyces</i>	18
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material	23
3.1.1. Microrganismos	23
3.1.2. Meios de Cultura	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Obtenção das Culturas dos Microrganismos e Sua Manutenção	24
3.2.2. Padronização do Inóculo	24
3.2.3. Avaliação do Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015	25
3.2.4. Atividade Antagônica da Cultura de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 Sobre as Linhagens de <i>E. coli</i>	27
3.2.5. Análise Estatística	28

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Curva de Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015	30
4.2. Atividade Antagônica da Cultura de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 Sobre as Linhagens de <i>E. coli</i>	32
5.0. CONCLUSÕES	38
6.0. PERSPECTIVAS	41
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDA

$\mu_{\max}$	- Índice Máximo de Crescimento Específico
a. C.	- Antes de Cristo
ATP	- Adenosina Trifosfato
AMPc	- Adenosina 5'-Monofosfato Cíclico
ECAD	- <i>E. coli</i> que se adere difusamente
ECEA	- <i>E. coli</i> enteroagregativa
ECEH	- <i>E. coli</i> entero-hemorrágica
ECEI	- <i>E. coli</i> enteroinvasiva
ECEP	- <i>E. coli</i> enteropatogênica
ECET	- <i>E. coli</i> enterotoxigênica
ECST	- <i>E. coli</i> produtoras da Shiga Toxina
FAO/ WHO	- Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization
GMPc	- Guanosina 5'-Monofosfato Cíclico
IgA	- Imunoglobulina A
IL-2	- Interleucina-2
IL-5	- Interleucina-5
IL-6	- Interleucina-6
IL-8	- Interleucina-8
ILSI	- International Life Science Institute
kDa	- Kilo Dáltons
LACEN	- Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral
LBFM	- Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos
LT	- Toxina Termolábil
p	- Nível de Significância Estatística de um Teste
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pI	- Ponto Isoelétrico
S	- Coeficiente de Sedimentação Ribossomal
SHU	- Síndrome Hemolítico Urêmica

ST	- Toxina Termoestável
Stx	- Shiga Toxina (Shiga-like Toxin)
Stx1 e 2	- Shiga Toxina 1 e 2
t_g	- Tempo de Duplicação Celular
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
UFC/ mL	- Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
UFPEDA	- Coleção de Cultura Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
v/v	- Volume por volume
X	- Concentração de Microrganismos no Final da Fase Logarítmica
X_0	- Concentração de Microrganismos no Início da Fase Logarítmica

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Principais causas de mortalidade infantil, em crianças menores de cinco anos, em 2002, no mundo.	6
Figura 02.	Fotomicrografias de <i>E. coli</i> . Microscopia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> sorotipo O157:H7. Microscopia ótica de <i>E. coli</i> .	7
Figura 03.	Esquema demonstrativo do mecanismo de patogenicidade apresentado pelas linhagens não-invasivas (ECEP, ECET, ECEA, ECED e ECEH) e invasivas (ECEI) de <i>E. coli</i> .	10
Figura 04.	Distribuição gastrointestinal da microflora humana.	12
Figura 05.	Efeitos benéficos e atributos patogênicos associados aos microrganismos constituintes da flora intestinal.	13
Figura 06.	Mecanismos de ação dos probióticos no trato intestinal	17
Figura 07.	Fotomicrografia eletrônica de varredura de <i>S. cerevisiae</i> . Reprodução por brotamento.	18
Figura 08.	Porcentagem dos constituintes da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> .	19
Figura 09.	Aspecto macroscópico das colônias de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 e <i>S. boulardii</i> 17 cultivadas em agar Sabouraud, à 35°C	21
Figura 10.	Esquema para enumeração das unidades formadoras de colônia por mililitro das culturas de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 e <i>S. boulardii</i> 17, nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata.	26
Figura 11.	Esquema para avaliação do antagonismo microbiano das culturas de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 e <i>S. boulardii</i> 17 sobre as linhagens de <i>E. coli</i> (UFPEDA 84, sorotipo O157:H7 e LBFM 10).	27

- Figura 12.** Curva representativa do crescimento microbiano de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e de *S. boulardii* (probiótico padrão), cultivado nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata através da enumeração das células viáveis durante 48 horas de incubação à 35°C. 31
- Figura 13.** Antagonismo microbiano exercido por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, cultivado nos meios líquidos de Sabouraud ou de Batata; ou por *S. boulardii* 17, nos meios líquidos de Sabouraud ou de Batata, em co-cultura com as linhagens de *E. coli* ao longo de 24 horas de co-cultura. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Características das principais classes de toxinas produzidas pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .	20
Tabela 02	Índice máximo de crescimento específico e tempo de geração celular de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015 e <i>S. boulardii</i> cepa 17, nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata, durante a fase exponencial de crescimento.	32

RESUMO

No Brasil, o aumento no isolamento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e a freqüente incidência de diarreias causadas por linhagens patogênicas de *Escherichia coli* ocasionam elevados gastos com hospitalização. Estes fatores têm contribuído para que vários pesquisadores busquem formas alternativas no tratamento das doenças infecciosas. Visando um provável uso de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 como probiótico, a capacidade antagonista desta levedura sobre o crescimento das linhagens de *E. coli* UFPEDA 84, da coleção de cultura do Departamento de Antibióticos, LBFM10, produtora de β -lactamase e uma do sorotipo entero-hemorrágica O157:H7 foi investigada. Os resultados foram comparados aos obtidos para a levedura *Saccharomyces boulardii* 17, cientificamente reconhecida como probiótica. Nos ensaios para avaliação do antagonismo microbiano, foram utilizadas culturas de *E. coli* e *Saccharomyces*, padronizadas em 10^6 e 10^7 UFC/mL, respectivamente. A inibição do crescimento da cultura bacteriana foi avaliada através da enumeração das células viáveis durante o período de 24 horas de incubação a 35°C. Em todos os ensaios foram observadas reduções significativas ($p < 0,001$) das culturas bacterianas. Ao término do experimento foram obtidas reduções superiores a $2,5 \log_{10}$ UFC/mL, para *E. coli* UFPEDA 84 e $2,0 \log_{10}$ UFC/mL, para o sorotipo entero-hemorrágico O157:H7 e para a linhagem produtora de β -lactamase. O caráter antagonista de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 sugere seu uso potencial no tratamento de diarreias causadas por *E. coli*, entretanto estudos adicionais para caracterização definitiva como probiótico são necessários.

ABSTRACT

In Brazil, the antimicrobial resistant microorganisms isolation increasing as well as frequent diarrhea incidence raised by *Escherichia coli* pathogenic lineages occasion high hospitalization costs. These factors have contributed so that several researchers seek alternative forms for the infective diseases treatment. Aiming a probable use of *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 yeast as a probiotic, the antagonistic capacity of this yeast concerning the *E. coli* UFPEDA 84 lineages growth, from the Antibiotic Department culture collection, LBFM10, a β -lactam producer and a O157:H7 enterohemorrhagic serotype were investigated. The results were compared to those obtained for the *Saccharomyces boulardii* 17 yeast once it was scientifically recognized as probiotic. During rehearsals for microbial antagonism evaluation, *E. coli* and *Saccharomyces* standardized cultures were used at 10^6 and 10^7 UFC/mL respectively. The bacterial culture growth inhibition was appraised through the feasible cells enumeration during the 24 hours incubation period at 35°C. In all rehearsals, bacterial cultures ($p < 0,001$) significant reductions were observed. At the end of the experiment, reductions greater than 2,5 Log₁₀ UFC/mL for *E. coli* UFPEDA 84 and 2,0 Log₁₀ UFC/mL, for the O157:H7 enterohemorrhagic serotype and for β -lactam producer lineage were obtained. The *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 antagonistic feature suggests its potential use in diarrhea caused by *E. coli* treatment, however, additional studies for conclusive characterization as probiotic are indispensable.

1.0 INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

A gastroenterite infecciosa, representada principalmente pela diarreia dos viajantes, causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica, e pela diarreia causada por rotavírus, é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, responsável por milhões de mortes, elevados custos com hospitalização e morbidade (FAO/ WHO, 2001; RIBEIRO, 2000; VICTORIA et al., 2000). As linhagens patogênicas de *E. coli* estão entre as principais causadoras de infecções intestinais desta natureza. O crescente aumento da resistência aos antimicrobianos adquirida nos ambientes hospitalares, através do uso de antibióticos na clínica médica e veterinária e/ ou por transferência gênica entre bactérias de origem humana e animal, tem-la descrita, entre outros microrganismos, como um dos principais agentes de infecções nosocomiais (MORA et al., 2005; TRABULSI et al., 1999; van den BOGAARD & STOBBERINGH, 2000).

Embora a terapia de re-hidratação oral seja uma forma eficiente de tratar as diarreias infantis, formas alternativas de tratamento antimicrobiano têm sido investigadas, uma vez que o uso de agentes profiláticos pode reduzir complicações médicas e custos do tratamento de doenças agudas. Dentre estas, o restabelecimento da flora microbiana pela introdução direta de microrganismos não patogênicos (probióticos) ou de nutrientes (prebióticos) capazes de estimular o crescimento dos microrganismos pré-existentes no trato gastrintestinal são as formas mais promissoras (McFARLAND et al., 1995; NOVERR & HUFFNAGLE, 2004; RIBEIRO, 2000).

O uso de microrganismos na produção de alimentos e bebidas e sua associação a efeitos benéficos são antigos, datando de 7.000 a.C. e 4.000 a.C., pelos sumérios e egípcios, respectivamente, que os utilizavam na produção de cerveja, queijo e pão. Em 1907, Elie Metchnikoff, relatou o farto consumo de leite fermentado por búlgaros, associando a longevidade apresentada por estes à modificação da atividade da microflora intestinal realizada pelos lactobacilos ingeridos (DEMAIN, 1981; GIBSON & FULLER, 2000).

No entanto, investigações a cerca do uso destes microrganismos como promotores do bem estar só tiveram maior ênfase a partir dos anos 1980 com o surgimento dos alimentos funcionais, no Japão, e após a proibição do uso de antibióticos, em doses subterapêuticas, como agentes promotores do crescimento e no tratamento de enfermidades em animais, em 1969 pelo comitê dirigido pelo Prof. Michael Swann - Swann Committee (EDQVIST & PEDERSEN, 2001; FAO/ WHO, 2001; FERREIRA & KUSSAKAWA, 1999; FULLER, 1989).

Embora alguns estudos relatem os efeitos benéficos de culturas probióticas ao consumo humano e animal, é necessária a investigação de parâmetros relacionados a sua segurança e atividade (AZEVEDO & GODARD, 1999; FAO/ WHO, 2001; JURGENS et al., 1997; KAUR et al., 2002; KORNEGAY et al., 1995; LIN et al., 1991; ROBINSON, 1997; SCHIFFRIN et al., 1995; TOUHY et al., 2003). Ser capaz de resistir a ácidos orgânicos e sais biliares, aderir às células epiteliais entéricas, estimular a resposta imune e influenciar benéficamente as atividades metabólicas do hospedeiro são alguns parâmetros analisados. Apresentar alto conteúdo protéico e nutricional, ser capaz de degradar ou reagir com substâncias tóxicas com potencial cancerígeno e reduzir os níveis de colesterol sérico são outras características importantes (DUNNE et al., 1999; GIBSON et al., 1997; SANDERS, 1993).

Estima-se que no trato gastrointestinal existam cerca de 10^{14} bactérias, pertencentes a 400-1000 espécies de microrganismos saprofíticos e patogênicos vivendo em equilíbrio. Manter ou restabelecer este equilíbrio, por meio de probióticos ou prebióticos, é muito importante para a saúde de seu hospedeiro, pois além de modular os processos metabólicos e imunológicos em indivíduos saudáveis, estes microrganismos impedem a colonização de outros patogênicos e a incidência de doenças (FERREIRA & TESHIMA, 2000; DANONE NUTRITOPICS, 2002; LEVY, 2000; TOUHY, 2003).

Assim, a investigação do potencial probiótico da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015, como possível forma de controle de enfermidades provocadas por *E. coli*, foi o objetivo principal deste trabalho. Para isso, a avaliação

do crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata foi comparado ao observado para a levedura padrão: *Saccharomyces boulardii* 17 – Floratil® MERCK. A co-culturabilidade *in vitro* entre *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e as linhagens de *E. coli*: *E. coli* de coleção **UFPEDA 84**, *E. coli* produtora de β -lactamase **LBFM 10** e *E. coli* entero-hemorrágica do sorotipo **O157:H7**, foi realizada.

Com a finalidade de observar se a redução nas unidades formadoras de colônia da bactéria durante o período de incubação com a levedura era compatível com os resultados apresentados por *S. boulardii* 17, sua atividade antagonista sobre *E. coli* também foi observada.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gastreenterites

As gastroenterites, doenças que se caracterizam pela inflamação da mucosa gástrica ou intestinal, apresentam etiologia variada: vírus (rotavírus), algumas bactérias, toxinas fúngicas ou bacterianas, protozoários ou helmintos. Entretanto, a intolerância à lactose, as doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn, colite ulcerativa e pouchite), a síndrome do intestino irritado, o supercrescimento bacteriano no intestino delgado, o uso de antibióticos e o estresse são outros fatores que levam ao desconforto gastrointestinal (McFARLAND et al., 1995; ROLFE, 2000; SULLIVAN & NORD, 2002; TORTORA et al, 2003).

A gastroenterite infecciosa, representada principalmente pela diarreia dos viajantes e pela diarreia causada por rotavírus, é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, responsável por cerca de 25% dos custos totais com hospitalização, no Brasil, e por altas taxas de mortalidade infantil - 1,5 milhão de crianças menores de cinco anos, em países em desenvolvimento, e morbidade (figura 01) (FAO/ WHO, 2001; RIBEIRO, 2000; ROLFE, 2000; VICTORIA et al., 2000).

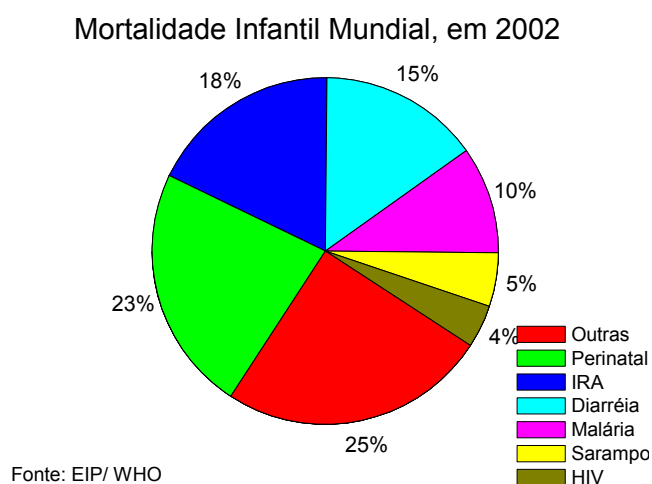


Figura 01. Principais causas de mortalidade infantil, em crianças menores de cinco anos, em 2002, no mundo. IRA – Infecção Respiratória Aguda; HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana. Fonte: EIP/ WHO, 2005.

Dentre os microrganismos causadores destas diarreias, *E. coli* (figura 02), um bacilo pertencente à família Enterobacteriaceae, se destaca como principal causador da diarreia infantil, dos viajantes e das infecções nosocomiais, além daquelas decorrentes da ingestão de alimentos crus ou mal cozidos, ocorrente nos países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Japão (IRINO et al., 2005; MORA et al., 2005; TRABULSI et al., 1999).

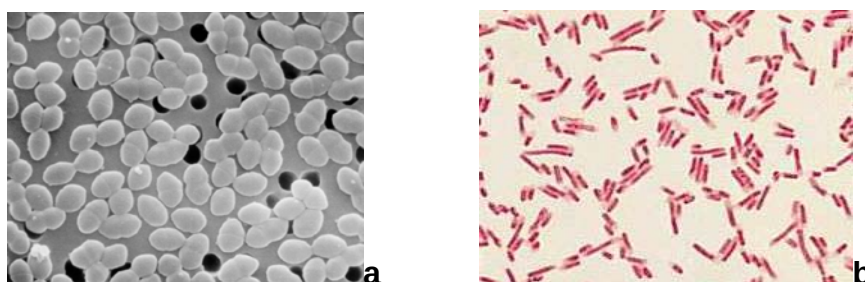


Figura 02. Fotomicrografias de *E. coli*. **(a)** Microscopia eletrônica de varredura de *E. coli* sorotipo O157:H7. **(b)** Microscopia ótica de *E. coli*. Fonte: <www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteria/img/EcoliO157H7CDC.jpg>; <www.nirgal.net/graphics/e_coli.jpg>.

As características de virulência das linhagens de *E. coli* variam, permitindo classificá-la em dois grandes grupos: aquelas capazes de causar infecções intestinais e aquelas associadas às infecções extra-intestinais. Adicionalmente, elas são classificadas, de acordo com sua composição antigênica, em sorogrupos (antígenos somáticos ou O), sorotipos (antígenos flagelares ou H) e antígenos capsulares (antígenos K) (CAMPOS et al., 2004; TRABULSI et al., 1999).

As linhagens causadoras de infecções extra-intestinais estão freqüentemente associadas às infecções urinárias, à meningite neonatal e à bacteremia, responsáveis por cerca de 90% e 40-50% dos casos de infecção urinária e bacteremia, respectivamente, e uma das principais causas de meningite neonatal. Entre as linhagens diarreicogênicas, são distinguidas as categorias: enteropatogênica (*ECEP*), enterotoxigênica (*ECET*), enteroinvasiva (*ECEI*), enteroagregativa (*ECEA*), que se adere difusamente (*ECAD*) e entero-hemorrágica

(*ECEH*) (CAMPOS et al., 2004; RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; TRABULSI et al., 1999).

As *ECEP* são responsáveis pela grande maioria das diarreias em crianças menores de um ano (diarreia infantil), principalmente nos países subdesenvolvidos. Seu mecanismo de patogenicidade consiste na adesão inicial às células entéricas e posterior perda das vilosidades intestinais. A formação da lesão *Attachment/Effacement* (lesão A/E), ocorre após o evento da transdução de sinal, que resulta no aumento de cálcio intracelular, liberação de inositol-fosfato, fosforilação de várias proteínas e acúmulo de microfilamentos de actina abaixo do local de adesão à célula intestinal (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; TRABULSI et al., 1999).

Conhecida como a principal causadora da diarreia dos viajantes, as *ECET* são responsáveis por cerca de 50-60% dos casos descritos, embora este tipo de bactéria também possa causar infecções em lactentes. A produção das enterotoxinas termolábil (LT), semelhante à toxina colérica, e termoestável (ST) causam profundas alterações no metabolismo celular, atuando no aumento dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc, respectivamente, e na saída de íons e água, resultando em diarreia aquosa aguda (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; TRABULSI et al., 1999).

Intimamente relacionadas a *Shigella*, as *ECEI* possuem características bioquímicas, antigênicas, genéticas e patogênicas muito semelhantes a este microrganismo. Seu mecanismo de patogenicidade consiste principalmente em sua capacidade invasora e disseminação adjacente à célula intestinal, causando colite, febre e diarreia sanguinolenta ou não. Elas acometem mais freqüentemente crianças, maiores de seis meses, e adultos (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; TRABULSI et al., 1999).

As *ECEA* são conhecidas por formar um padrão agregativo quando associadas a células das linhagens Hep-2 ou HeLa. Seu mecanismo patogênico se caracteriza pela aderência agregativa e pela capacidade de estimular a produção e secreção de muco pela mucosa intestinal, além da produção de diversas moléculas

bacterianas. As diarreias podem se manifestar de cor verde, sem sangue, a formas mais graves (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002).

Outra categoria é a *ECAD*, que se caracteriza pela forma difusa a qual se adere a superfície de células das linhagens Hep-2 ou HeLa. Seu mecanismo de patogenidade é pouco conhecido, tendo sido identificadas duas adesinas distintas, uma de natureza fimbrial e outra não-fimbrial (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002; TRABULSI et al., 1999).

As *ECEH* são caracterizadas pela produção de uma toxina virulenta, verotoxina ou Shiga toxina (Stx), denominado-as de *E. coli* produtoras de Shiga toxina (*ECST*). Este grupo de microrganismos foi inicialmente descrito em 1977, no Canadá, por Konowalchuck, porém sua relação com diarreias sangüíneas em crianças foi estabelecida apenas no início dos anos 1980, por O'Brien e colaboradores, e associada a casos de síndrome hemolítica urêmica (*SHU*) em 1985, por Karmali e colaboradores (CLEARY, 2004; TARR et al., 2005).

A *ECEH* sorotipo O157:H7 (figura 02a) é o membro mais comum, dentre mais de 500 sorotipos. Sua infecção pode causar desde diarreia branda a colite hemorrágica, podendo evoluir à sua forma mais tóxica: *SHU*, que pode levar a seqüelas renais, como disfunção renal e hipertensão. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de alimentos crus ou mal cozidos, como carnes, hambúrgueres, saladas, leite e queijo e por água contaminada e transmissão interpessoal (CHEN et al., 2004; CLEARY, 2004; GARG et al., 2005; MORA et al., 2005).

O mecanismo de patogenidade da *ECEH* deve-se principalmente à ação de suas toxinas (Stx1 e 2). Após adesão superficial ao receptor globotriasilceramida ou Gb₃, estas toxinas se internalizam à célula por um processo conhecido por endocitose mediada por receptor. A vesícula formada associa-se ao aparato de Golgi e retículo endoplasmático, de onde o fragmento A₁ da Stx é translocado ao citoplasma. A clivagem do único resíduo de adenina no RNAr 28S da subunidade ribossomal 60S, pelo fragmento A₁, inibe a síntese protéica e leva à morte celular (TARRAGÓ-TRANI & STORRIE, 2004; TRABULSI et al., 1999). Porém a expressão

da proteína denominada intimina, responsável pela aderência e colonização ao epitélio intestinal, causando lesões do tipo A/E, e da proteína enterohemolisina são outros componentes importantes no processo patogênico (GARCÍA-ALJARO et al., 2005; MORA et al., 2005; RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002). A figura 03 demonstra como ocorre o mecanismo de patogenicidade apresentado pelas linhagens de *E. coli*.

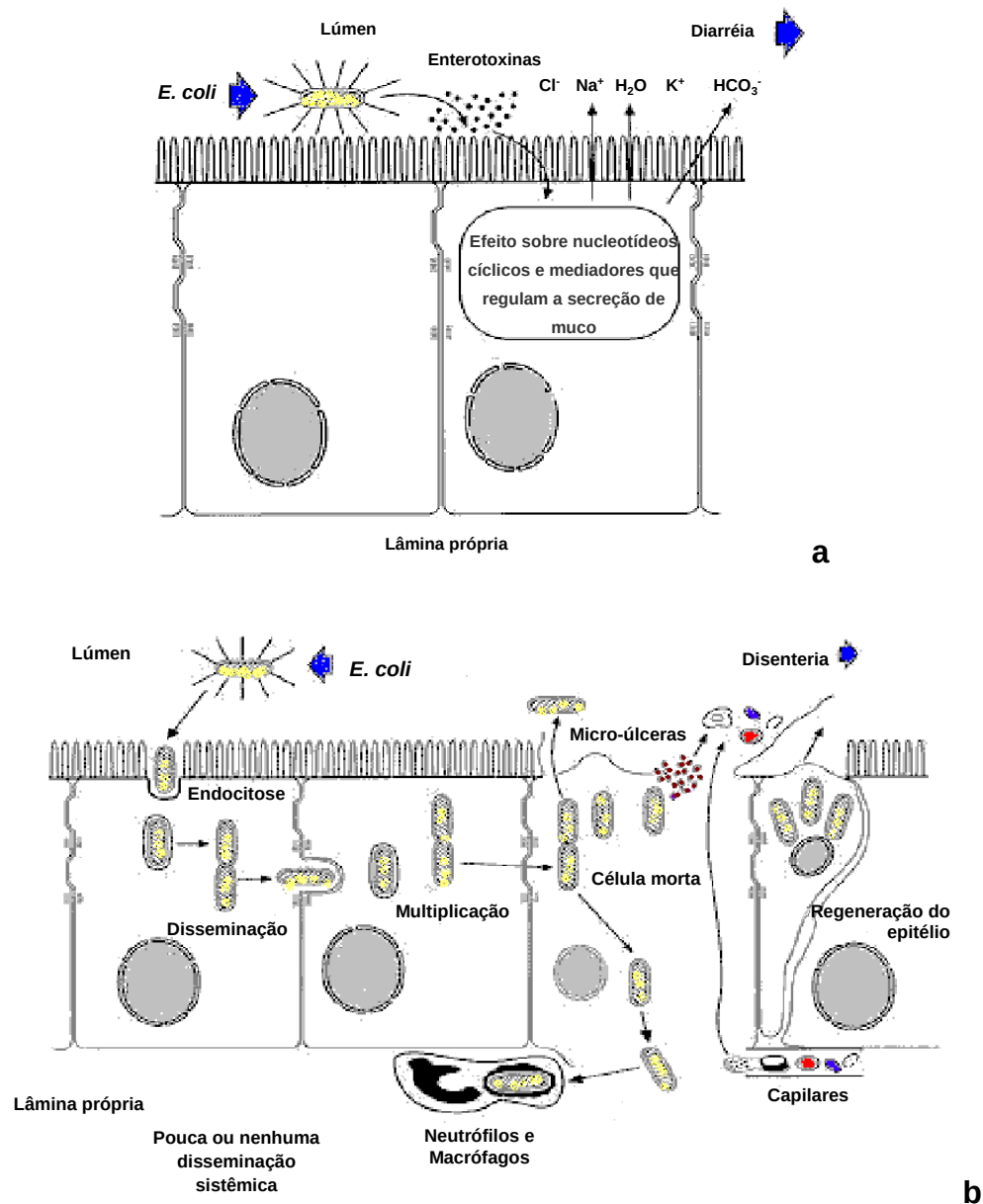


Figura 03. Esquema demonstrativo do mecanismo de patogenicidade apresentado pelas linhagens (a) não-invasivas (ECEP, ECET, ECEA, ECED e ECEH) e (b) invasivas (ECEI) de *E. coli*. Fonte: EVANS Jr & EVANS, 2005.

A terapia de re-hidratação oral apresenta eficácia no tratamento da diarreia infantil. Porém, as linhagens patogênicas de *E. coli* e de outros enteropatógenos, apresentam resistência à terapia antimicrobiana. Esta resistência, ocasionada pelo uso concomitante de antibióticos ou seus análogos por homem e animais, transferência gênica e pelo uso de antimicrobianos em ambientes hospitalares, leva à busca de formas alternativas de tratamento (FAO/ WHO, 2001; MORA et al., 2005; NICOLI & VIERA, 2000; van den BOGAARD & STOBBERINGH, 2000). Neste contexto, o desenvolvimento de probióticos e prebióticos tem sido investigado, encorajando-nos a desenvolver este trabalho.

2.1.1 Microflora Gastrintestinal Humana

A microflora gastrintestinal humana é bastante variada quanto à sua composição e distribuição ao longo dos 150-200 m² de trato gastrintestinal. Dentre as 400 e 1000 espécies, 97% são anaeróbios estritos e 3% aeróbios ou anaeróbios facultativos. Os gêneros mais comuns são *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, como anaeróbios; e como aeróbios, *E. coli* e *Salmonella* (bacilos Gram-negativos), *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e a levedura *Candida albicans* (BERG, 1996; HOLZAPFEL et al., 1998; NOVERR & HUFFNAGLE, 2004).

As regiões que apresentam maior colonização (boca, íleo e cólon) possuem baixo potencial óxido redutor e reduzida motricidade intestinal; ao contrário do estômago, duodeno e jejuno, que são banhados por fluidos agressivos, como ácido clorídrico, bile e suco pancreático, apresentando menor conteúdo bacteriano, como esquematizado na figura 04 (BERG, 1996; HOLZAPFEL et al., 1998).

Esta colonização (10^{14} bactérias), que chega a ser dez vezes maior que a soma de todas as células de um indivíduo adulto se inicia logo após o nascimento pelos microrganismos presentes no canal vaginal da mãe e ambiente. Sua instalação, em recém-nascidos, pode levar de seis a doze meses e depende de

fatores relacionados ao tipo de parto, permanência duradoura em incubadora e tipo de amamentação (BERG, 1996; HOLZAPFEL et al., 1998; NICOLI & VIEIRA, 2000).

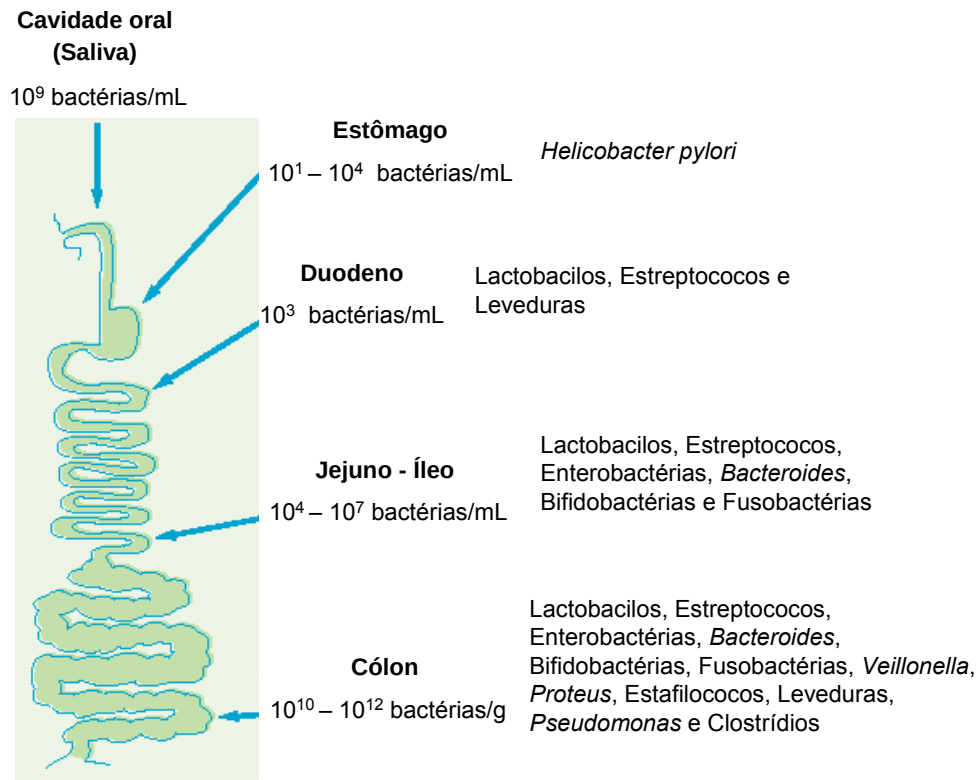


Figura 04. Distribuição gastrointestinal da microflora humana. Fonte: BERG, 1996; DANONE NUTRITOPICS, 2004.

Responsáveis pelo fornecimento de 40 a 50% da energia necessária para o funcionamento das células intestinais, os microrganismos da microflora gastrointestinal também desempenham função de barreira (impedem a instalação de patógenos entéricos), e de interação com o hospedeiro (estimulam a resposta imune específica), dentre outros efeitos benéficos (figura 05) quando em equilíbrio (DANONE, 1997; GIBSON et al., 1997; TUOHY, 2003).

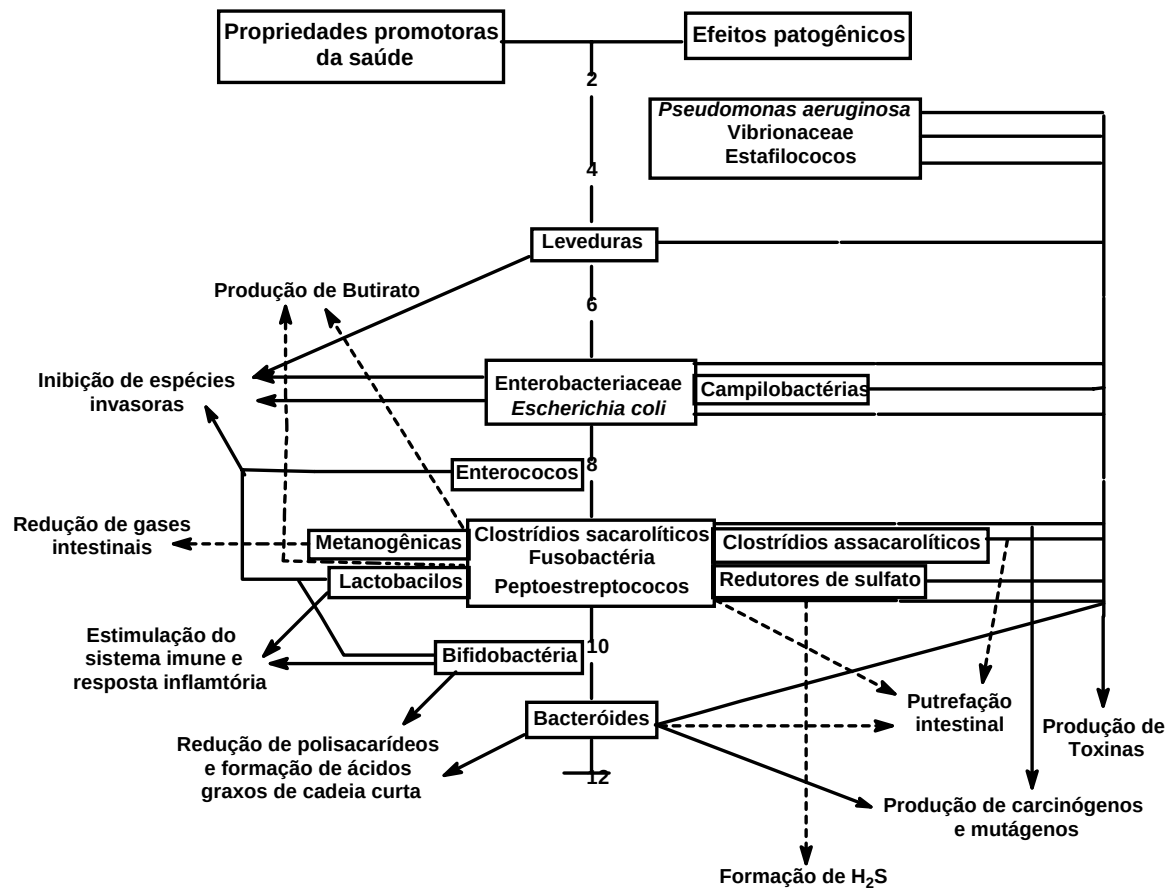


Figura 05. Efeitos benéficos e atributos patogênicos associados aos microrganismos constituintes da flora intestinal. Os microrganismos representados estão expressos em Log₁₀ unidades formadoras de colônia por grama de fezes. Fonte: GIBSON et al., 1997.

Fortemente influenciados pela condição física do hospedeiro (idade, estresse, ambiente e saúde) e pela composição da dieta (uso de antibióticos, mudança nos hábitos alimentares e alimentos contaminados), a quebra do equilíbrio microbiano provoca profundas alterações na saúde de seu hospedeiro. Desordens intestinais, doenças inflamatórias, artrite, desenvolvimento de alergias e asma estão entre as principais consequências, que são mais notáveis em crianças e idosos (HOLZAPFEL et al., 1998; LEVY, 2000; NOVERR & HUFFNAGLE, 2004).

Uma forma de manter este equilíbrio é incorporar à alimentação alimentos ou ingredientes alimentares funcionais, como probióticos, prebióticos, vitaminas e minerais, que além de atuarem de forma benéfica, ajudam a melhorar as funções intestinais através da estimulação de bactérias não patogênicas (DANONE, 1999; FERREIRA & TESHIMA, 2000; STANTON et al., 2001).

2.2 Probióticos

Os probióticos são atualmente definidos pela “Food and Agriculture Organization of the United Nations” e “World Health Organization” como microrganismos vivos, cuja ingestão sob um número suficiente, exerce efeitos benéficos à saúde além daqueles relacionados à nutrição básica (FAO/ WHO, 2002).

Outrora definidos como substâncias produzidas por protozoários, que estimulavam o crescimento de outros microrganismos (LILLY & STILLWELL, 1965 apud FAO/ WHO, 2001), e como suplementos para ração animal, que atuavam na flora intestinal (PARKER, 1974 apud FULLER 1989), os probióticos também foram definidos como microrganismos vivos usados como suplemento alimentar no melhoramento do equilíbrio microbiano intestinal (FULLER, 1989) e no tratamento e prevenção de patologias específicas, numa quantidade de células viáveis satisfatória (GUARNER & SCHAAFSMA, 1998; HAVENAAR & HUIS in't VELD, 1992 apud ROLFE, 2000).

Originalmente, o termo probiótico adveio das observações realizadas pelo biólogo russo Elie Metchnikoff, em 1907, ao associar a longevidade dos búlgaros ao farto consumo de leite fermentado. Ele sugeriu que o leite acidificado promovia modificações benéficas na atividade da microflora intestinal pela redução de seus efeitos tóxicos, chegando a isolar e usar o lactobacilo em algumas triagens alimentares humanas, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1908 (GIBSON & FULLER, 2000; ROLFE, 2000).

No entanto, somente após a restrição do uso de antibióticos como agentes promotores do crescimento animal, em 1969 pelo Comitê presidido pelo professor Michael Swann, e com o surgimento dos alimentos funcionais, nos anos de 1980, no Japão, as pesquisas relacionadas ao uso de microrganismos vivos, como ingredientes alimentares, foram enfatizadas (EDQVIST & PEDERSEN, 2001; FAO/ WHO, 2001; FERREIRA & KUSSAKAWA, 1999; STANTON et al., 2001).

Atualmente o uso de microrganismos vivos como ingredientes alimentares e formulações farmacêuticas ou para alimentação animal, conhecidos por “Direct Fed

Microrganisms” (DFM), são largamente comercializados nos países da Europa (Reino Unido, Alemanha, França, Espanha, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Suécia e Holanda), Estados Unidos e Japão. No Brasil, a comercialização desses produtos é tímida, resumindo-se a alguns tipos de iogurtes e leites fermentados (Yakult®, YAKULT e Chamyto®, NESTLÉ), produtos veterinários (Vitacanis®, MICROBIOL) e preparações farmacêuticas (Floratil®, MERCK e Florax®, HEBRON) (DANONE, 1996; MAIA et al., 2001; STANTON et al. 2001).

A classificação de um microrganismo como probiótico, depende da investigação de parâmetros relacionados a sua origem e segurança. A investigação de efeitos benéficos, realizados por meio de testes *in vitro* compreende a (DANONE NUTRITOPICS, 2002; DUNNE et al., 1999; ERICKSON & HUBBARD, 2000; FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002; GIBSON & FULLER, 2000; GUARNER & SCHAAFSMA, 1998; HOSONO et al., 1997; ROLFE, 2000; SANDERS, 1993):

- ❖ resistência à acidez gástrica, bile e a enzimas pancreáticas;
- ❖ aderência a determinadas linhagens de células epiteliais humanas;
- ❖ atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas (produção de substâncias antimicrobianas, modificadoras do pH intestinal ou de seu potencial óxido-redutor);
- ❖ habilidade em reduzir a adesão de microrganismos patogênicos a superfícies;
- ❖ análise dos efeitos sobre células imunocompetentes e sua capacidade antimutagênica;
- ❖ ausência de caracteres patogênicos (transferência de genes de resistência a antibióticos, capacidade de causar infecções sistêmicas ou estimular excessivamente o sistema imune);
- ❖ capacidade em inativar substâncias pro-carcinogênicas (redução dos níveis de enzimas bacterianas - β -glicuronidase, nitroreductase, urease e azoredutase) ou reduzir a excreção mutágenos nas fezes e urina;
- ❖ estímulo a imunidade do hospedeiro (imunidade humoral, produção de citocinas e atividade fagocitária);

- ❖ exibir resistência a processos tecnológicos (liofilização, resfriamento, secagem, produtos empregados na manufatura de medicamentos) e condições de estocagem.

Dentre os microrganismos freqüentemente utilizados como probióticos estão algumas espécies de *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius* e *L. plantarum*), *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* e algumas espécies de *Bifidobacterium*. Com menor freqüência são citados *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *Bacillus subtilis*, *B. toyo*, *Escherichia coli* EMO e *E. coli* Nissle 1917 (FERREIRA & KUSSAKAWA, 1999; FULLER, 1989; NICOLI & VIEIRA, 2000; SULLIVAN & NORDI, 2002; TOUHY et al., 2003).

A aplicação destes microrganismos na medicina humana, na medicina veterinária e na pecuária é ampla e vai desde o tratamento de disfunções intestinais e modulação da resposta imune à regulação de funções metabólicas e ao melhoramento das qualidades comerciais dos animais de corte (DUNNE et al., 1999; HUBER, 1997).

A redução dos sintomas típicos da intolerância à lactose (dor abdominal, flatulência e diarreia), o aumento na atividade fagocitária de células leucocitárias e redução do nível de colesterol são alguns dos efeitos benéficos observados no homem (DANONE NUTRITOPICS, 2004; LIN et al., 1991; SCHIFFRIN et al., 1995).

Nos animais, é mais observado o rápido ganho de peso, o aumento nos níveis de imunoglobulinas, a melhora no balanço energético, o aumento na produção de leite e melhora na digestibilidade dos nutrientes (ERASMUS, et al., 1992; JURGENS et al., 1997; KORNEGAY et al., 1995; LARA-FLORES et al., 2003; ROBINSON, 1997).

2.2.1 Mecanismos de Ação

Os mecanismos de ação pelo quais os microrganismos probióticos atuam no trato intestinal ainda não foram totalmente esclarecidos. Vários autores propõem que a efetividade destes microrganismos esteja relacionada à ação antagonista direta ou indireta sobre patógenos intestinais (FULLER, 1989; KAUR et al., 2002; NICOLI; VIEIRA, 2000; ROBERFROID, 2000; ROLFE, 2000; TUOHY, 2003), realizada pela:

- ❖ *exclusão competitiva de patógenos intestinais*, pela competição por nutrientes ou sítios de adesão bacteriana na superfície do epitélio intestinal;
- ❖ *produção de substâncias inibitórias*, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem reduzir o pH intestinal ou ter ação antimicrobiana;
- ❖ *inativação de toxinas*, através da competição ou degradação dos sítios de ligação na superfície do epitélio intestinal, ou da clivagem da toxina;
- ❖ *estímulo da imunidade*, específica e não específica;
- ❖ *neutralização de substâncias carcinogênicas*, através da redução dos níveis de aminas tóxicas e de enzimas bacterianas ou sua excreção nas fezes e urina.

A figura 06 representa alguns mecanismos de ação destes microrganismos.

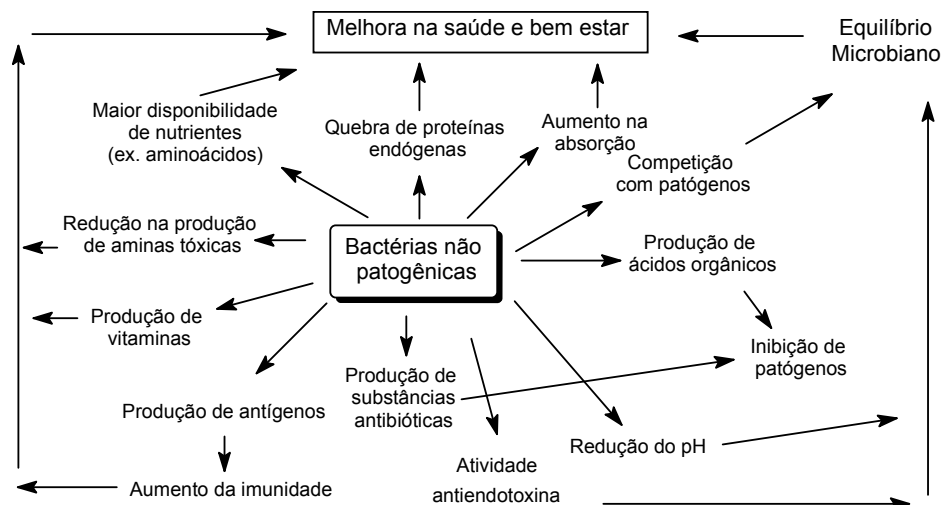


Figura 06. Mecanismos de ação dos probióticos no trato intestinal. Fonte: FERREIRA & KUSSAKAVA (1999).

2.3 O Gênero *Saccharomyces*

Pertencente à Divisão Eumycota, a Classe Ascomycetes representa um numeroso grupo de fungos, contendo cerca de 2.700 gêneros, dentre estes o gênero *Saccharomyces* (GRIFFIN, 1994).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Saccharomyces* apresentam morfologia leveduriforme, podem formar pseudomicélios, e têm dimensões em torno de 10 μm (figura 07). Amplamente distribuídos na natureza, são freqüentemente encontrados na superfície de folhas e frutos sob a forma de um pó de coloração branca, e tem participação fundamental nos processos de fermentação industrial (MEDINA et al., 1997; PÉREZ et al., 2001; TORTORA et al, 2003).

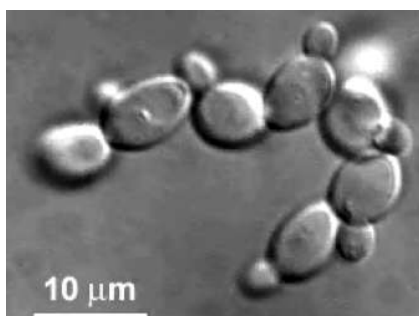


Figura 07. Fotomicrografia eletrônica de varredura de *S. cerevisiae*. Reprodução por brotamento. Fonte: <www.cybersciences.com/.../n2053_scerevisiae.jpg>.

Dependendo das condições físicas do meio ou da natureza do substrato, estes microrganismos podem se multiplicar de forma assexuada (brotamento) ou sexuada (conjugação), apresentar respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa e crescer em temperaturas variáveis de 0 a 40°C (temperatura ótima de crescimento para *S. cerevisiae* - 31-34°C e 37°C, para *S. boulardii*) e apresentar mudanças na composição de suas estruturas, como a parede celular (GIUDICI et al., 1998; LODDER & KREGER-VAN RIJ, 1952; McCLARY & BOWERS, 1967; ROLFE, 2000; SANTA MARÍA, 1957).

A parede celular de *S. cerevisiae* compõe-se principalmente por polímeros de manose, polímeros de glicose, polímeros de N-acetilglicosamina e proteínas (figura 08). Ela apresenta alta capacidade elástica, fornece proteção mecânica e retém água (AGUILAR-USCANGA & FRANÇOIS, 2003; KLIS et al., 2002).

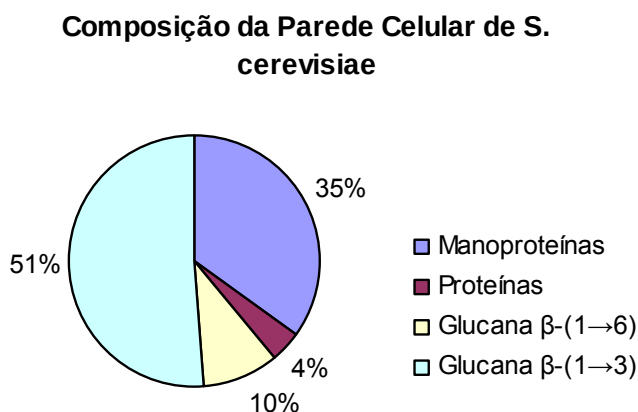


Figura 08. Porcentagem dos principais constituintes da parede celular de *S. cerevisiae*. Fonte: KLIS et al., 2002.

A diversidade enzimática de *S. cerevisiae* permite a utilização de vários tipos de carboidratos. A glicose é a fonte preferida de carbono. No entanto, frutose, alguns dissacarídeos (galactose, manose, melibiose e sacarose), trissacarídeos (rafinose) e polissacarídeos (amido) também são utilizados. Transportados para o meio intracelular pelos mecanismos transportadores de hexoses (glicose, frutose e manose), galactose permease ou maltose permease, estes carboidratos participam da via glicolítica. Como fontes de nitrogênio, amônia, glutamina e glutamato são as preferidas. Compostos como asparagina, arginina, prolina, uréia e muitos outros aminoácidos são convertidos nestes ou incorporados na biossíntese de proteínas (GAGIANO et al., 2002).

O fenômeno “killer”, observado por Bevan e Makower, em 1963, para algumas linhagens de *S. cerevisiae*, refere-se a capacidade destas leveduras em impedir o crescimento de outras durante processos fermentativos, por meio de exotoxinas. Distintas quanto ao pH, peso molecular, receptor na parede celular e modo de ação

as características principais das toxinas K1, K2 e K28 estão descritas na tabela 01 (FLEGELOVÁ et al., 2002; MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002; MEDINA et al., 1997; PÉREZ et al., 2001).

Tabela 01. Características das principais classes de toxinas produzidas pelas linhagens de *S. cerevisiae*.

Toxina	pI	Peso Molecular	Receptor	Mecanismo de Ação
K1	4,5	19 KDa α 9,5 KDa β 9 KDa	Glucana β -(1,6)	Formação de canais transmembrana permeáveis a íons (H^+ e K^+) e ATP
K2	4,2-4,3	α 21,5 KDa β 21,5 KDa	Glucana β -(1,6)	Ação semelhante a Toxina K1
K28	4,4	16 KDa α 10,5 KDa β 11 KDa	Resíduo de manose α -1,3 de uma manoproteína de 185 KDa	Inibição da síntese de DNA, impedindo a separação das células mãe e filha

As linhagens de *S. cerevisiae* com fenótipo “killer” são bastante empregadas nos processos de fermentação industrial de bebidas, principalmente vinho, cerveja e saké, e tem tido aplicabilidade investigada no campo da medicina, taxonomia, genética, tecnologia alimentar e controle biológico (KORNEGAY et al., 1995; MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002; MEDINA et al., 1997; PÉREZ et al., 2001; POLONELLI & MORACE, 1986).

As propriedades probióticas de *S. cerevisiae* e *S. boulardii* (figura 09) têm sido amplamente investigadas. Algumas linhagens são empregadas no tratamento ou prevenção de distúrbios intestinais em vários países, principalmente da Europa, devido a sua capacidade em resistir às barreiras gastrintestinais e a rápida eliminação após interrupção do tratamento, cujas são características importantes consideradas na provável classificação dos probióticos (BRANDÃO et al., 1998; CASTAGLIUOLO et al., 1999; CORTHIER, 1997; DAHAN et al., 2003; FILHO-LIMA et al., 2000; GEDEK, 1999; MAIA et al., 2001; PECQUET et al., 1991; PSOMAS et al., 2001; QAMAR et al., 2001; ROLFE, 2000).



Figura 09. Aspecto macroscópico das colônias de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 (a) e *S. boulardii* 17 (b) cultivadas em agar Sabouraud, à 35°C.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Microrganismos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os microrganismos:

- ❖ *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 – pertencente à Coleção de Cultura Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.
- ❖ *S. boulardii* 17 – isolado do medicamento Floratil®, comercializado pela MERCK Indústria Farmacêutica.
- ❖ *E. coli* UFPEDA 84 – pertencente à Coleção de Cultura Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.
- ❖ *E. coli* sorotipo O157:H7 – linhagem gentilmente fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral – LACEN, do Estado de Pernambuco.
- ❖ *E. coli* LBFM 10 – linhagem isolada de paciente com sintomas de infecção intestinal, resistente a Ampicilina (10µg) e Cefalotina (30µg), do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.1.2 Meios de Cultura

Para o cultivo, manutenção e ensaios de atividade antagônica entre *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 ou *S. boulardii* 17 e as linhagens de *E. coli*, foram utilizados os meios de cultura:

- ❖ *Agar Sabouraud 4% Dextrose* VETEC® (peptona de caseína 5,0 g/L; peptona de carne 5,0 g/L; glicose 40,0 g/L; agar 15,0 g/L; pH 7,0).
- ❖ *Meio Líquido de Sabouraud 2% Dextrose* MERCK® (peptona de carne 5,0 g/L; peptona de caseína 5,0 g/L; glicose 20,0 g/L; pH 5,6).

- ❖ *Agar Dextrose Batata* BIOBRÁS® (infuso de batata 4,0 g/L; dextrose 20,0 g/L; agar 15,0 g/L; pH 5,6).
- ❖ *Meio Líquido de Batata* (infuso de batata 400,0 g/L; glicose 20,0 g/L; pH 5,6).
- ❖ *Agar Mueller Hinton* OXOID® (caseína hidrolisada 17,5 g/L; amido 1,5 g/L; agar 17,0 g/L; pH 7,4).
- ❖ *Meio Líquido de Mueller Hinton* BIOBRÁS® (extrato de carne 2,0 g/L; hidrolisado ácido de caseína 17,5 g/L; amido de batata 1,5 g/L; pH 7,4).

Todos os meios foram preparados e autoclavados a 121°C durante 15 minutos, conforme instrução de seus fabricantes. Para o meio líquido de batata, o infuso de 400,0 g de batata inglesa lavada e com casca foi preparado. Após fatiada e pesada, a batata foi adicionada a um litro de água destilada e cozida, por 15 minutos em forno microondas. Depois de cozida, a batata foi amassada, filtrada em gaze e acrescentados 20,0 g de glicose, onde o pH foi ajustado a 5,6.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das Culturas dos Microrganismos e Sua Manutenção

As culturas de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, *S. boulardii* 17 e as linhagens de *E. coli* foram inicialmente inoculadas nos meios líquidos de Sabouraud e de Mueller-Hinton, respectivamente, e incubadas por 24h a 35°C. Estas culturas foram mantidas em agar Sabouraud e agar Mueller-Hinton, incubados a 35°C, em estufa.

3.2.2 Padronização do Inóculo

De uma cultura de 12 horas de incubação para a levedura, em meio líquido de Sabouraud ou de Batata, uma alíquota foi retirada e transferida para um novo meio líquido, numa concentração de 10% (v/v); de modo a obter uma cultura padronizada

em 10^7 UFC/ mL. Para o inóculo bacteriano, uma cultura incubada por 12 horas em meio líquido de Mueller-Hinton foi padronizada em 10^6 UFC/ mL, partir da diluição ao centésimo (10^{-2}) da turbidez equivalente ao tubo 1 da escala de McFarland.

3.2.3 Avaliação do Crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015

Uma alíquota de uma cultura de 48 horas de incubação, em meio líquido de Sabouraud ou de Batata, foi retirada e transferida para um novo meio líquido, numa concentração de 0,1% (v/v), de modo a obter uma cultura padronizada em 10^5 UFC/ mL, que foi incubada por 48 horas a 35°C.

Nos intervalos regulares de 0h, 1h $\frac{1}{2}$, 3h, 4h $\frac{1}{2}$, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 36h e 48h, alíquotas foram retiradas e diluídas seriadamente de 10^{-1} a 10^{-6} , em tubos contendo água destilada esterilizada. 10µL foram plaqueadas para enumeração das células viáveis, em meio sólido de Sabouraud ou Batata, e incubadas a 35°C, durante 24h, como demonstrado na figura 10.

A partir da enumeração das células viáveis, foi plotado um gráfico que representou o crescimento microbiano expresso pelo Log_{10} das UFC/ mL em função do tempo, em horas. Com este gráfico, foi possível calcular a velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\max}$) e o tempo de geração (t_g) da população microbiana calculados de acordo com as equações (1) e (2) (LULDEKING, 1967).

$$\ln x / x_0 = \mu_{\max} \cdot t \quad (1)$$

Onde: x – concentração de microrganismos no final da fase logarítmica, UFC/ mL

x_0 – concentração de microrganismos no início da fase logarítmica, UFC/ mL

t – tempo, h

$\mu_{\max}$ – velocidade de crescimento específico durante a fase logarítmica, h^{-1}

$$t_g = \ln 2 / \mu_{\max} \quad (2)$$

Onde: $\ln 2 = 0,69$; quando $x/x_0 = 2$

t_g – tempo de geração

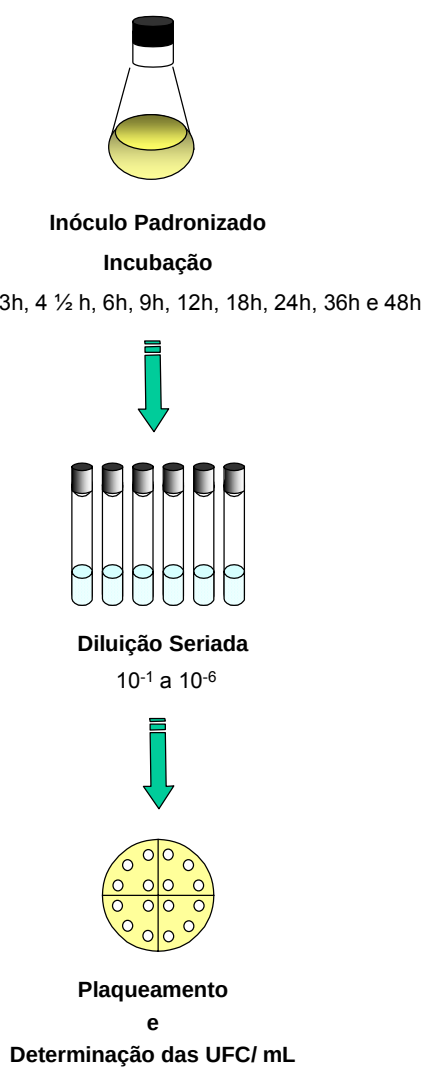


Figura 10. Esquema para enumeração das unidades formadoras de colônia por mililitro das culturas de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17, nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata.

3.2.4 Atividade Antagônica da Cultura de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 Sobre as Linhagens de *E. coli*

A determinação da atividade antagônica das culturas de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 foi realizada com culturas padronizadas em 10^7 UFC/ mL, sobre as linhagens de *E. coli* padronizadas em 10^6 UFC/ mL. Para isso, as culturas foram previamente incubadas nos meios líquidos de Sabouraud, de Batata e de Mueller-Hinton, por um período de 12h a 35°C, conforme ilustrado na figura 11.

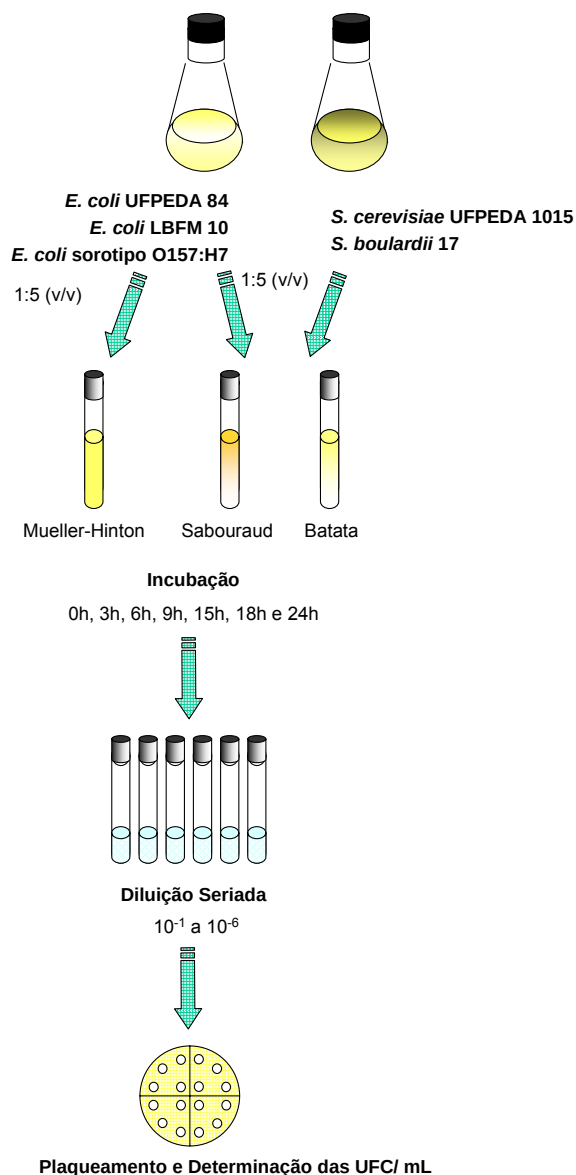


Figura 11. Esquema para avaliação do antagonismo microbiano das culturas de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 sobre as linhagens de *E. coli* (UFPEDA 84, sorotipo O157:H7 e LBFM 10).

3.2.5 Análise Estatística

A avaliação do crescimento das culturas de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, *S. boulardii* 17 e linhagens de *E. coli*, em co-cultura com as leveduras, foram obtidas pela conversão da média aritmética da contagem de células viáveis em logaritmos comuns (Log_{10} das UFC/ mL). A média aritmética e o desvio padrão foram determinados de valores observados em três repetições independentes de cada experimento.

A análise estatística foi trabalhada através do teste de análise de variância (One way ANOVA), para observação da influência dos meios de cultura utilizados no crescimento das leveduras sobre o crescimento dos microrganismos; ou do teste *t-Student* (Two populations) ao nível de significância de $p < 0,001$, para observação da influência das leveduras sobre o crescimento das bactérias. O crescimento das leveduras foi analisado pela regressão linear.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do Crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015

O crescimento microbiano é fortemente influenciado por fatores físicos e químicos do meio onde o microrganismo é cultivado. Temperatura, pH, pressão osmótica, água e fontes de nutrientes, entre outros são os fatores de maior importância. Quando associados com um determinado fim permitem desde a caracterização de estruturas celulares, como a parede celular, à obtenção ou aumento na produção de substâncias de interesse, industrial ou não (AGUILAR-USCANGA & FRANÇOIS, 2003; TORTORA et al., 2003).

Objetivando a obtenção de uma massa celular satisfatória, utilizando para isso condições simples de cultivo, *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 foi cultivados nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata, submetido a uma fermentação simples, sem agitação, a 35°C, durante 48 horas. Seu perfil de crescimento foi analisado através de uma curva de crescimento construída a partir de alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo (0h, 1h ½, 3h, 4h ½, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 36h e 48h).

A curva de crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 foi comparada à curva correspondente ao crescimento de *S. boulardii* 17, uma levedura com propriedades probióticas, sob as mesmas condições de cultivo, o qual resultou em perfis de crescimento muito semelhantes (figura 12).

A análise de regressão linear demonstrou que o crescimento exponencial (fase Log) dos microrganismos em função do meio líquido não variou significativamente ($p > 0,001$). A velocidade de crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 foi levemente superior ao da levedura padrão - *S. boulardii* 17, sugerindo que à temperatura estudada (35°C) seu crescimento é mais efetivo (tabela 02).

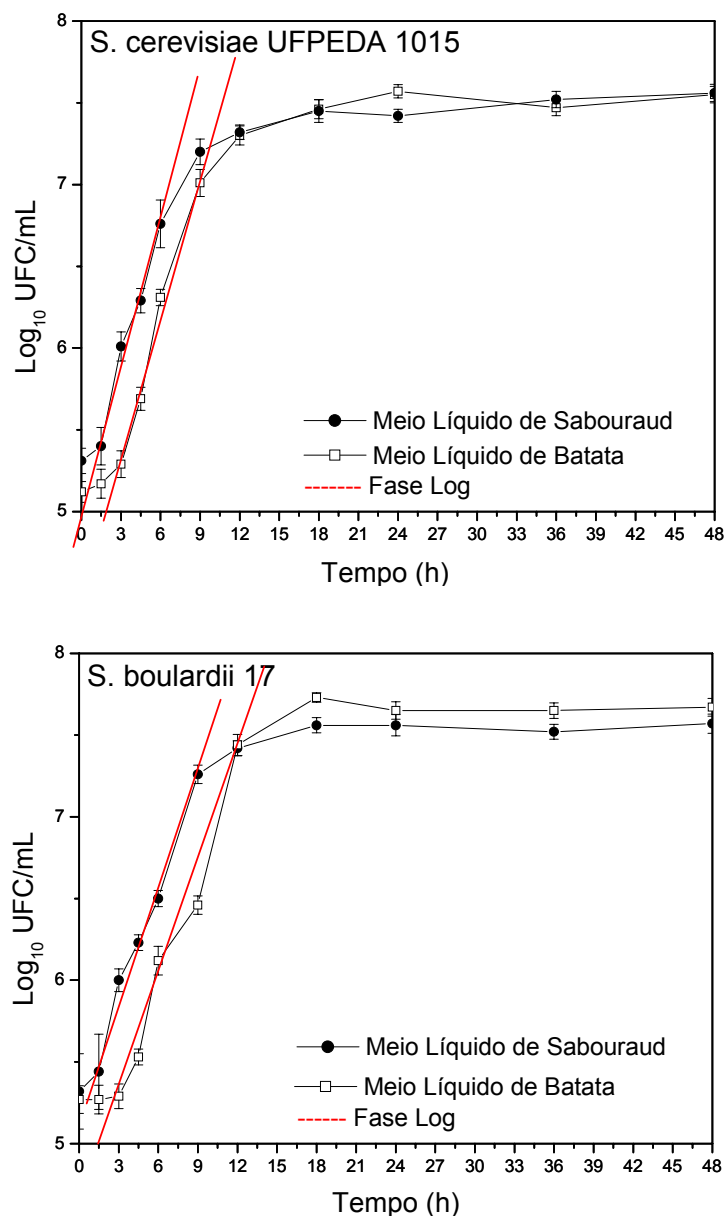


Figura 12. Curva representativa do crescimento microbiano de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e de *S. boulardii* (probiótico padrão), cultivado nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata através da enumeração das células viáveis durante 48 horas de incubação à 35°C.

Tabela 02. Velocidade de crescimento específico e tempo de geração celular de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17, nos meios líquidos de Sabouraud e de Batata, durante a fase exponencial (fase Log) de crescimento.

Microrganismo	Meio	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	t _g (h)	Coefficiente de Correlação
<i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015	Sabouraud	0,048	14,3	0,990
	Batata	0,046	15	0,993
<i>S. boulardii</i> 17	Sabouraud	0,037	18,6	0,993
	Batata	0,037	18,3	0,986

$\mu_{\max}$ - Velocidade de crescimento específico

t_g - tempo de geração celular

4.2 Atividade Antagônica da Cultura de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 Sobre as Linhagens de *E. coli*

A propriedade que algumas linhagens de *S. cerevisiae* apresentam em antagonizar o crescimento de outras leveduras foi descrita em 1963, por Bevan e Makower, como fenômeno “killer” (FLEGELOVÁ et al., 2002; MARQUINA et al., 2002).

Conhecidas por produzir toxinas capazes de impedir o crescimento de outras leveduras, as linhagens produtoras de toxinas “killer” exibem como mecanismo de ação a indução da lise celular por meio da formação de poros na membrana plasmática, resultando no efluxo de íons potássio e ATP, ou interrupção da duplicação celular através da inibição da síntese de DNA (MARQUINA et al., 2002; PALFREE & BUSSEY, 1979).

Vislumbrando a possibilidade de usar as leveduras de fenótipo “killer” como inibidoras do crescimento de microrganismos patogênicos, em meados de 1980,

Polonelli e Morace investigaram a capacidade inibitória de algumas leveduras sobre outros microrganismos, porém o efeito antagônico não foi confirmado ter resultado da ação de toxinas “killer” (POLONELLI & MORACE, 1986).

Como o emprego de *S. cerevisiae* em fermentações industriais de usinas sucro-alcooleiras, vinhatarias e panificadoras são muito comuns, a descrição do fenômeno “killer” se torna uma importante característica empregada na seleção das linhagens utilizadas na produção de bebidas, em especial, tendo em vista resguardar o padrão de qualidade do produto final, como o vinho, por exemplo (FLEGELOVÁ et al., 2002; MARQUINA et al., 2002; MEDINA et al., 1997; PÉREZ et al., 2001).

Neste estudo, a capacidade inibitória de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 sobre três linhagens de *E. coli* foi investigada. As culturas, cultivadas no meio líquido de Sabouraud ou de Batata, para a levedura, e no meio líquido de Mueller-Hinton, para as linhagens bacterianas, foram co-culturadas à proporção de 1:5 (v/v), durante o período de 24 horas. A cultura de *S. boulardii* 17 (Floratil® MERCK), cultivada sob as mesmas condições de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, foi considerada como o probiótico padrão.

Conforme o que se observa na figura 13, *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 exerceram um efeito antagônico sobre o crescimento de todas as linhagens de *E. coli* estudadas. O crescimento das linhagens bacterianas co-culturadas com *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 ou *S. boulardii* 17 apresentou reduções estatisticamente significativas ($p < 0,001$) e superiores a $1,0 \text{ Log}_{10}$ a partir das três primeiras horas de incubação, nas unidades formadoras de colônia, quando comparado às culturas controle.

Ao término das 24 horas de incubação da co-cultura entre *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 ou *S. boulardii* 17 e *E. coli* foram obtidas reduções superiores a $2,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, para a linhagem de coleção - UFPEDA 84; e cerca de $2,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ para a linhagem produtora de β -lactamase (LBFM 10) e enterohemorrágica do sorotipo O157:H7.

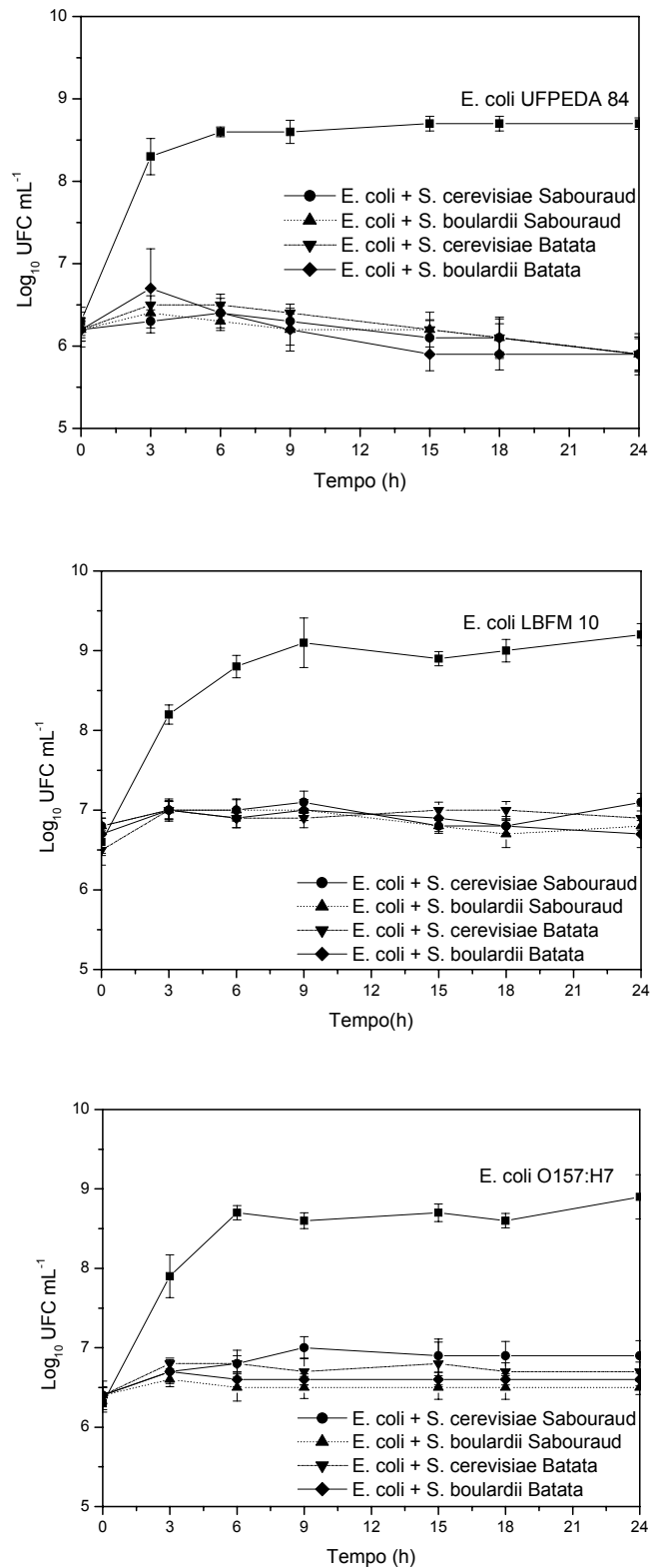


Figura 13. Antagonismo microbiano exercido por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, cultivado nos meios líquidos de Sabouraud (●) ou de Batata (▼); ou por *S. boulardii* 17, nos meios líquidos de Sabouraud (▲) ou de Batata (◆), em co-cultura com as linhagens de *E. coli* (■) ao longo de 24 horas de co-cultura.

Quando a redução das populações de *E. coli* foi comparada em função do meio de cultura utilizado no cultivo das leveduras nenhuma diferença significativa ($p > 0,001$) foi observada na população viável das linhagens bacterianas co-culturadas, bem como não foi observada diferença significativa entre o efeito antagônico exercido por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 ou *S. boulardii* 17.

O método da co-culturabilidade, realizado entre microrganismos probiótico e patogênico, além de permitir a observação do efeito antagônico, por meio do acompanhamento dinâmico do crescimento do microrganismo patogênico (CHAVEERACH et al., 2004), possibilita a observação da influência de fatores como o pH, a disponibilidade de nutrientes (FOOKS & GIBSON, 2002; TSAI et al., 2004), a produção de substâncias antimicrobianas (CHAVEERACH et al., 2004) e a capacidade de neutralizar toxinas (CASTAGLIUOLO et al., 1999).

O mecanismo de ação exercido por *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* tem sido amplamente investigado. Para Gedek, o efeito protetor desempenhado por *S. boulardii* em casos de infecções intestinais pode estar relacionado à ligação de microrganismos patogênicos à superfície celular desta levedura, cuja é rica em monômeros de manose. A observação da aglutinação de linhagens enterohemorrágicas de *E. coli* (sorotipos O157:H7 e O157:H-) e *Salmonella enteritidis* var. *typhimurium* à superfície *S. boulardii* reforçam a idéia (GEDEK, 1999).

Entretanto, a ligação específica de toxinas produzidas por patógenos intestinais à superfície da levedura *S. boulardii* (Laboratório Merck) também tem sido proposto. A presença de sítios específicos de ligação para a toxina colérica na parede celular de *S. boulardii* foi descrito por Brandão e colaboradores, através de teste de marcação isotópica (^{125}I) (BRANDÃO et al., 1998).

A excreção de proteínas capazes de impedir a ligação de toxinas patogênicas a células intestinais é outro mecanismo protetor atribuído a *S. boulardii* (Laboratório Biocodex) em infecções desta natureza. Para Czerucka e colaboradores (CZERUCKA et al., 1994 apud BRANDÃO et al., 1998), uma proteína de 120 KDa produzida por *S. boulardii* é capaz de neutralizar o efeito patogênico da toxina colérica através de sua suposta ligação aos receptores celulares desta toxina. E

Castagliuolo e colaboradores defendem a capacidade de uma proteína de 54 KDa em digerir as toxinas A e B, de *C. difficile*, e seus receptores nas células entéricas humanas (CASTAGLIUOLO et al., 1999).

Outro provável mecanismo de ação conferido a *S. boulardii* é a modulação da resposta imune específica da mucosa intestinal à infecção por patógenos. O aumento significativo dos níveis de IgA anti-toxina A no intestino delgado de animais tratados com *S. boulardii* (Laboratório Biocodex), após exposição à toxina ou toxóide A de *C. difficile*, foi demonstrado por Qamar e colaboradores (QAMAR et al., 2001). Assim como a expansão dos componentes linfóides da lâmina intestinal e a redução ou ausência de danos histológicos, em animais infectados por *V. cholerae* e tratados com *S. cerevisiae* W303, foram notados (BRANDÃO et al., 1998).

Resultados semelhantes também foram observados em animais infectados por *S. enteritidis* var. *typhimurium* ou *Shigella flexneri* tratados com *S. boulardii* (Laboratório Merck) (FILHO-LIMA et al., 2000; RODRIGUES et al., 1996).

A não alteração das populações bacterianas observadas nas porções intestinais ou nas fezes dos animais infectados tratados com *S. boulardii* (Microbiol, Com. Ind. Ltda.) (MAIA et al., 2001) ou *S. cerevisiae* (Laboratório UCB) (PECQUET et al., 1991), sugerem a modulação do sistema imune do hospedeiro, a modulação na produção ou ação da toxina patogênica ou a competição por sítios de adesão à parede intestinal como prováveis mecanismos de ação.

A redução da frequência e duração das diarreias ocasionadas pelo uso de antibióticos (McFARLAND et al., 1995), a redução da produção de interleucina-8 (IL-8) e aumento da resistência transmembranar durante infecção de células intestinais humana (linhagem T84) por enteropatógenos também tem sido atribuídas a *S. boulardii* (Laboratório Biocodex) (CASTAGLIUOLO et al., 1999; DAHAN et al., 2003).

Nossos resultados sugerem que o efeito antagônico exercido por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, sobre o crescimento das linhagens de *E. coli* estudadas, deve ser muito parecido com o mecanismo desempenhado por *S. boulardii* 17, reforçando seu potencial como probiótico.

Considerando a descrição do fenômeno “killer” para algumas linhagens de *S. cerevisiae*, há possibilidade do efeito antagônico exercido pela linhagem estudada, *S. cerevisiae* UFPEDA 1015, em estar relacionada a este mecanismo, o que não descarta o envolvimento de outro mecanismo de ação.

Estudos referentes à sobrevivência de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 ao trânsito gastrointestinal foram paralelamente realizados em nosso laboratório como tema de trabalhos de conclusão de curso (CÂMARA, 2004; MORAIS, 2004). Nossos resultados se mostraram relevantes comparados a outros, quanto a ácido e a bile tolerâncias, para algumas linhagens de *S. cerevisiae* (AGARWAL et al., 2000; van der AA KÜHLE et al., 2004; PSOMAS et al., 2001). No entanto, a realização de estudos adicionais, visando à caracterização definitiva de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 como probiótico, é necessária e se fazem alvos de futuras investigações de nosso grupo de pesquisa; cujo visa conhecer profundamente o mecanismo de ação desta levedura.

5.0 CONCLUSÕES

5.0 CONCLUSÕES

A avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17, através da enumeração das unidades formadoras de colônia, durante 48 horas de incubação à 35°C, demonstrou períodos de crescimento exponencial variáveis entre os microrganismos dependendo dos meios líquidos utilizados, meio líquido de Sabouraud ou de Batata.

O cultivo das leveduras nos meios líquidos de Sabouraud ou de Batata não demonstrou diferença significativa ($p > 0,001$), quando comparados entre si, sobre o crescimento das espécies de *Saccharomyces* estudadas.

O tempo de geração e o índice máximo de crescimento específico apresentado por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17, nos meios líquidos de Sabouraud ou de Batata, foram semelhantes. Estes parâmetros de crescimento representam um crescimento satisfatório.

As espécies *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 exerceram um efeito antagônico sobre o crescimento de todas as linhagens de *E. coli* estudadas (UFPEDA 84, LBFM 10 e sorotipo O157:H7). A co-cultura demonstrou a redução significativa ($p < 0,001$), superior a $1,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, no crescimento do inóculo quando comparado ao controle, após três horas de incubação, perdurando até o fim do experimento.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,001$) entre a atividade antagônica exercida por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 sobre a população bacteriana. Os meios de cultura utilizados para o cultivo destas leveduras também não apresentaram diferença significativa.

A semelhança entre o efeito antagônico exercido por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 e *S. boulardii* 17 sobre o crescimento das linhagens de *E. coli* estudadas sugere que o mecanismo desempenhado por estas leveduras possa ser parecido. A ocorrência do fenômeno “killer”, para *S. cerevisiae*, ou a produção de outra

substância com capacidade inibitória pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito antagônico exercido por essa linhagem.

6.0 PERSPECTIVAS

6.0 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para futuras investigações relacionadas a caracterização de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 como probiótico, podemos citar a necessidade de isolar o fator ou caracterizar os mecanismos responsáveis pela atividade antagonista exercida por este microrganismo sobre o crescimento de *E. coli*, observado em experimentos *in vitro*.

O estudo do efeito de *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 sobre a infecção causada por *E. coli* ou outros patógenos intestinais, em experimentos *in vivo*.

A avaliação de sua capacidade em desconjugar ácidos biliares, estimular a resposta imune (específica e não específica), bloquear enzimas implicadas na formação de radicais livres (nitroredutase, β -glicuronidase e azoredutase), adesão às células epiteliais intestinais, entre outros.

Investigar a capacidade em utilizar carboidratos de importância prebiótica, como inulina e fosfooligossacarídeos.

Desenvolver preparações probióticas (iogurtes ou preparações farmacêuticas/veterinárias) tendo *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 como um probiótico.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L.C.; SAHOO, A. & PATHAK, N. N. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, p. 270-3, 2000.

AGUILAR-USCANGA, B. & FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 268-74, 2003.

AZEVEDO, V. & GODARD, A. L. B. Bactérias lácticas. **Rev. Biotec. Ciênc. Desenv.**, v. 8, p. 80-4, 1999.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 430-5, 1996.

BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; BAMBIRRA, E. A.; AMARAL, S. C.; FIETTO, L. G.; TROPPIA, M. J. M.; NEVES, M. J.; SANTOS, R. G.; GOMES, N. C. M. & NICOLI, J. R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 2, p. 564-8, 1998.

CÂMARA, M. F. Avaliação da ácido-tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* cepa FR 1972. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 26p. 2004.

CAMPOS, L. C.; FEANZOLIN, M. R. & TRABULSI, L. R. Diarreagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-52, 2004.

CASTAGLIUOLO, I.; RIEGLER, M. F.; VALENICK, L.; LAMONT, J. T. & POTHOUOLAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effect of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 1, p. 302-7, 1999.

CHAVEERACH, P.; LIPMAN, L. J. A. & van KNAPEN, F. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni* coli. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 90, p. 43-50, 2004.

CHEN, Y.; LIMING, S. H. & BHAGWAT, A. A. Occurrence of inhibitory compounds in spent growth media that interfere with acid-tolerance mechanisms of enteric pathogens. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 91, p. 175-83, 2004.

CLEARY, T. G. The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 260-5, 2004.

CORTHER, G. Antibiotic-associated diarrhoea: treatments by living organisms given by the oral route (probiotics). In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics 2 – Applications and Practical Aspects**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 40-64.

DAHAN, S.; DALMASSO, G.; IMBERT, V.; PEYRON, J. F.; RAMPAL, P. & CZERUCKA, D. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 766-73, 2003.

DANONE NUTRITOPICS. The health benefits of probiotics. France. n. 29. p. 1-16. 2004.

_____. The three lines of defense in human intestine. Effect of probiotics on body's natural defenses. France. n. 25. p. 1-17, 2002.

DANONE WORLD NEWSLETTER. Functional food – definitions, examples, and the place of fermented dairy products. France. n. 18. p. 1-32. 1999.

_____. The gastrointestinal microflora and fermented milks. France. n. 14. p. 1-21. 1997.

_____. Kefir. France. n. 11. p. 1-19. 1996.

DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. **Science**, v. 214, p. 987-95, 1981.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E. M. M.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F. & COLLINS, K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76 p. 279-92, 1999.

EDQVIST, L.-E. & PEDERSEN, K. B. Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. In: **Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000**. p.93-100. 2001.

EIP/ WHO (Evidence and Information for Police/ World Health Organization). Child and adolescent health and development. Disponível em: <www.who.int/child-adolescent-health/integr.htm>. Acesso em: 15 abr. 2005.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P.M. & KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 3056-65. 1992.

ERICKSON, K. L. & HUBBARD, N. E. Probiotic immunomodulation in health and disease. **J. Nutr.**, v. 130, p.403S-9S, 2000.

EVANS Jr, D. J. & EVANS, D. G. *Escherichia coli* in diarrheal disease. In: BARON, S (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th Ed. Disponível em: <gsbs.utmb.edu/microbook/ch025.htm>. Acesso em: 13 mai. 2005.

FAO/ WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/ WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

_____. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/ WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001.

FERREIRA, C. L. L. F. & TESHIMA, E. Prebióticos. **Rev. Biotec. Ciênc. Desenv.**, v. 16, p. 22-5, 2000.

FERREIRA, F. A. B. & KUSSAKAWA, K. C. K. Probióticos. **Rev. Biotec. Ciênc. Desenv.**, v. 8, p. 40-3, 1999.

FILHO-LIMA, J. V. M.; VIEIRA, E. C. & NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella*

enteritidis subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.365-70, 2000.

FLEGELOVÁ, H.; NOVOTNÁ, D.; VOJTÍSKOVÁ, K. & JANDEROVÁ, B. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 73-9, 2002.

FOOKS, L. J. & GIBSON, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 39, p. 67-75, 2002.

FOTOMICROGRAFIA Eletrônica de Varredura de *E. coli* sorotipo O157:H7. Disponível em: <www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteria/img/EcoliO157H7CDC.jpg>. Acesso em: 13 jun. 2004.

FOTOMICROGRAFIA Eletrônica de Varredura de *S. cerevisiae*. Disponível em: <www.cybersciences.com/.../n2053_scerevisiae.jpg>. Acesso em: 20 Nov. 2004.

FOTOMICROGRAFIA Óptica de *E. coli*. Disponível em: <www.nirgal.net/graphics/e_coli.jpg>. Acesso em: 20 Nov. 2004.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-78, 1989.

GAGIANO, M.; BAUER, F. F. & PRETORIUS, I. S. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 433-70, 2002.

GARCÍA-ALJARO, C.; MUNIESA, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; JOFRE, J. & BLANCH, A. R. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 246, p. 55-65, 2005.

GARG, A. X.; MOIST, L.; MATSELL, D.; THIESSEN-PHILBROOK, H. R.; HAYNES, R. B.; SURI, R. S.; SALVADORI, M.; RAY, J. & CLARK, W. Risk of hypertension and reduced kidneys function after acute gastroenteritis from bacteria-contaminated drinking water. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 173. 2005.

GEDEK, B. R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**, v. 42, p. 261-4, 1999.

GIBSON, G. R. & FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr.**, v. 130, p. 391S-95S, 2000.

GIBSON, G. R.; SAAVEDRA, J. M.; MacFARLANE, S. & MacFARLANE, G. T. Probiotics and intestinal infections. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics 2 – Applications and Practical Aspects**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 10-39.

GIUDICI, P.; CAGGIA, C.; PULVIRENTI, A. & RAINIERI, S. Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 811-9, 1998.

GRIFFIN, D. **Fungal Physiology** 2nd ed. New York, USA: Wiley – Liss, Inc., 1994. 458p.

GUARNER, F. & SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 237-8, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U. & HUIS in't VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOSONO, A.; KITAZAWA, H. & YAMAGUCHI, T. Antimutagenic and antitumor activities of lactic acid bacteria. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics 2 – Applications and Practical Aspects**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 89-132.

HUBER, J. T. Probiotics in cattle. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics 2 – Applications and Practical Aspects**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 162-86.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M. & GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 29-36, 2005.

JURGENS, M. H.; RIKABI, R. A. & ZIMMERMAN, D. R. The effect of dietary active dry yeast supplement on performance of sows during gestation-lactation and their pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 593-7, 1997.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K. & SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharmac. Sci.**, v. 15, p. 1-9, 2002.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K. & BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 239-56, 2002.

KORNEGAY, E. T.; RHEIN-WELKER, D.; LINDEMANN, M. D. & WOOD, C. M. Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1381-9, 1995.

LARA-FLORES, M.; OLIVERA-NOVOA, M. A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E. & LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquacult.**, v. 216, p. 193-201, 2003.

LEVY, J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, n. 1, p. S8-S10, 2000.

LIN, M.; SAVAIANO, D. & HARLANDER, S. Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 87-95, 1991.

LODDER, J. & KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The Yeast - A Taxonomic Story**. Amsterdam: North Holland Publish Company, 1952. 713p.

LULDEKING, R. Fermentation process kinetics. In: BLAKEBROUGH, N. (Ed.). **Biochemical and Biological Engineering Science Vol. 1**. London: Academic Press Inc. 1967. p. 181-243.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D. & POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.

MAIA, O. B.; DUARTE, R.; SILVA, A. M.; CARA, D. C. & NICOLI, J. R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Vet. Microbiol.**, v. 79, p. 183-9, 2001.

MARQUINA, D.; SANTOS, A. & PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **Int. Microbiol.**, v. 5, p. 65-72, 2002.

McCLARY, D. O. & BOWERS, W. D. Jr. Structural differentiation of obligately aerobic and facultatively anaerobic yeasts. **J. Cell Biol.**, v. 32, n. 2, p. 519-24. 1967.

McFARLAND, L. V.; SURAWICZ, C. M.; GREENBERG, R. N.; ELMER, G. W.; MOYER, K. A.; MELCHER, S. A.; BOWEN, K. E. & COX, J. L. Prevention of β -lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 90, n. 3, p. 439-48, 1995.

MEDINA, K.; CARRAU, F. M.; GIOIA, O. & BRACESCO, N. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 7, p. 2821-5, 1997.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M. ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I. & BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Res. Microbiol.**, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005.

MORAIS, E. A. Determinação da bile-tolerância de uma nova cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 38p. 2004.

NICOLI, J. R. & VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. **Ciênc. Hoje**, v. 28, n. 123, p. 34-8, 2000.

NOVERR, M. C. & HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 12, p. 562-88, 2004.

PALFREE, R. G. & BUSSEY, H. Yeast killer toxin: purification and characterisation of the protein toxin from *S. cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 93, n. 3, p. 487-93, 1979.

PECQUET, S.; GUILLAUMIN, D.; TANCREDE, C. & ANDREMONT, A. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 10, p. 3049-51, 1991.

PÉREZ, F.; RAMÍREZ, M. & REGODÓN, J. A. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 393-9, 2001.

POLONELLI, L. & MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, n. 5, p. 866-9, 1986.

PSOMAS, E.; ANDRIGHETTO, C.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; LOMBARDI, A. & TZANETAKIS, N. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and feta cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 69, p. 125-33, 2001.

QAMAR, A.; ABOUDOLA, S.; WARNY, M.; MICHETTI, P.; POTHOUKAKIS, C.; LaMONT, J. T. & KELLY, C. P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 4, p. 2762-5, 2001.

RIBEIRO Jr., H. Diarrheal disease in a developing nation. **Am. J. Gastroenterol.** v.95, n. 01, p. S14-S15, 2000.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1682S-7S, 2000.

ROBINSON, P. H. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to diets postpartum. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 1119-25, 1997.

RODRIGUES, A. C. P.; NARDI, R. M.; BAMBIRRA, E. A.; VIEIRA, E. C. & NICOLI, J. R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 81, p. 251-6, 1996.

RODRÍGUES-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Public Mex.**, v. 44, p. 464-75, 2002.

ROLFE, R. D. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

SANDERS, M. E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. **J. Dairy Sci.**, v. 76, n. 7, 1819-28, 1993.

SANTA MARÍA, J. Formation by *Saccharomyces cerevisiae* of asci with more than four spores. **J. Bacteriol.**, v. 74, n. 5, p. 692-3, 1957.

SCHIFFRIN, E. J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J. M. & DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of acid bacteria. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 491-7, 1995.

STANTON, C.; GANDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P. B. & ROSS, R. P. Market potencial for probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 476S-83S, 2001.

SULLIVAN, A. & NORDI, C. E. The place of probiotics in human intestinal infection. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 20, p. 313-9, 2002.

TARR, P. I.; GORDON, C. A. & CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic ureamic syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1073-86, 2005.

TARRAGÓ-TRANI, M. T. & STORRIE, B. A method for the purification of Shiga-like toxin 1 subunit B using a commercially available galabiose-agarose resin. **Prot. Expres. Purif.**, v. 38, p. 170-6, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre/RS: Ed. Artmed, 2003. 827p.

TOUHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W. & GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discov. Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. & CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo/ SP: Ed. Atheneu, 1999. 576p.

TSAI, C. C.; HUANG, L. F.; LIN, C. C. & TSEN, H. Y. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain *Enterococcus faecium* TM39. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 96, p. 1-12, 2004.

van den BOGAARD, A. E. & STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 327-35, 2000.

van der AA KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K. & JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, Available on line, 2004.

VICTORA, C. G.; BRYCE, J.; FONTAINE, O. & MONASCH, R. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bulet. World Health Organiz.**, v. 78, p. 1246-55, 200