

GEÍZA ALVES DE AZERÊDO

**EFEITOS DA INGESTÃO DE *ZYMOMONAS MOBILIS*
EM RATOS WISTAR.**

Recife, 2004.

Geíza Alves Azerêdo

Efeitos da Ingestão de *Zymomonas mobilis* em Ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao
colegiado do Programa de Pós-
graduação em Nutrição do Centro
de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de
Pernambuco para a obtenção do
grau de mestre em nutrição.

Mestranda: Geíza Alves de Azerêdo

Orientador: Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-Orientador: Edvaldo Rodrigues de Almeida

Recife, 2004

TÍTULO: Efeitos da ingestão de *Zymomonas mobilis* em ratos Wistar.

NOME: Geíza Alves de Azerêdo

TESE APROVADA EM: 02/04/2004

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

Edvaldo Rodrigues de Almeida

Sônia Souza Melo Cavalcanti

À família Azerêdo,

em especial à D. Tezinha, minha mãe,

pelo exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Ô tarefinha difícil, esta! E ainda dizem que o pior é escrever a dissertação!

É nessa hora que começamos a sentir que a meta está próxima de ser alcançada.

E para isto, várias pessoas, até mais do que aqui serão citadas, muito me ajudaram no delinear deste trabalho. A todos os outros, meu *Muito Obrigada!!!*

Professora Tânia Stamford: Muito obrigada pela orientação neste trabalho, mas sobretudo quero registrar a minha profunda gratidão pela confiança que depositou em mim, por todas as vezes que não me deixou abater, pelo valor dado a cada linha escrita, mesmo quando pouco dela se aproveitasse. E o seu humor? Com certeza sem ele também não teria conseguido. A senhora faz de qualquer problema solucionável, mesmo quando aparentemente não se vejam saídas imediatas. Isso se chama perseverança, coragem, mas, sobretudo fé, fé em Deus! Gostaria de dizer-lhe que admiro demais a senhora como profissional e como mulher. Eu realmente sou uma pessoa de sorte!

Professor Edvaldo Rodrigues de Almeida: tudo que aqui eu falasse com certeza seria bem menos do que eu sinto e menos ainda do que merece. Você sabe disso!

Professora Magali: quanta paciência teve comigo, principalmente porque eu nem sabia da existência desta bactéria *Zymomonas mobilis*... Sua dedicação foi fundamental para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada por tudo!

Professor Raul Manhães de Castro: ‘...Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, sem amor eu nada seria’. É isto: o amor às pessoas, à pesquisa, à vida, enfim, que faz com que seja um ser humano tão grandioso! Que maravilha ter tido o imenso prazer de lhe conhecer e de receber os seus ensinamentos de vida! Os levarei sempre comigo!

Professor Otamar: O que mais me chama a atenção é a sua modéstia ao transmitir os seus conhecimentos. Eis um grande *MESTRE!*

À secretária mais ‘braba’ e mais mãe que já conheci (**Neci**):

Eu gosto muito, muito, muito de você!!!

‘Para louvar a nossa mãe, todo o bem que se disser, nunca há de ser tão grande, como o bem que ela nos quer’.

Mário Quintana

Aos estagiários e funcionários do Departamento de Antibióticos:

Flavinho: Há um potencial em você tão grande, que você nem imagina! Desejo logo que seja descoberto e explorado. Vá em frente!

Polyanna: Te agradeço por tanta coisa – fins de semana dedicados à execução dos experimentos, paciência, abraços fraternos, a amizade, enfim. Torço muito pelo seu sucesso profissional. Lembre-se sempre: *você é capaz!*

João e Thiago: valeu pela ajuda, pelos momentos de descontração... Vocês são demais!

S. Zé, Aldeci, D. Josa, Lucilene, S. Alberto, Antônio, Marineide e Daniel, pela prestabilidade.

Aos meus amigos e amigas:

*"Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos:
conservar os velhos."*

Elmer G. Letterman

Tábata: minha amiga Tábata! Já te disse tantas vezes da tua importância na minha vida... mas nunca é demais quando se trata de você. Te agradeço pelas inúmeras vezes que me ouviu, que me apoiou, que me mostrou os erros, que entendia até o que eu nem conseguia dizer. Sentirei muitas saudades...

Tati: você fala tanto em seres humanos de espírito elevado e nem se dá conta de que é um deles! Pensando bem, talvez por isso mesmo que seja. São pessoas como você que fazem a vida valer à pena!

Cris: Você é uma pessoa iluminada, que brilha quando chega, e não é porque é loira (rss), ou não somente, mas porque transborda a alegria de seu espírito, fundamental para eu ter chegado até aqui. Valeu, Cris, por tudo!

Jaiciane: Valeu pelas vezes que veio me buscar à noite, aqui na UFPE, até mesmo nas suas noites de 'celebridade'. Valeu também por todos os 'boa sorte!', 'se precisar, liga!', 'vai dar tudo certo!'. Você nem imagina como me sentia bem ao ouvir isso! Você é muito legal, Jai! Te adoro!!!

Nayaninha: foi ao lhe conhecer que tive a real certeza de que anjos existem!

Jana: valeu pela força que me deu nos dias que se antecederam à defesa. Vc foi maravilhosa!!!!

Vanusa: sua sensibilidade ao me oferecer o seu computador na reta final do mestrado, assim que soube de que o meu havia quebrado, muito me sensibilizou. Te agradeço pela intenção em me ajudar!

Andréa (mestrado 2003): esta me acolheu em sua casa dias antes de entregar a dissertação, pois computador eu não tinha e o que vanusa tanto queria me disponibilizar estava quebrado. Andréa: jamais esquecerei esse seu ato! Que Deus te ilumine!

Jubaiana, Marilene: valeu pela torcida!!!

Marília: por todas as palavras de força, de coragem, por todos os abraços fraternos...

Zênia: como eu me identifiquei com vc, Zênia! Foi realmente um presente de Deus tê-la conhecido.

Dixis: Vc é demais!!!!

Patricinha Sobral: agradeço pela força, amizade, companheirismo...

Zé Viana: meu amigão Zé!!! Obrigada pelo carinho, viu! Vou lembrá-lo sempre como aquela pessoa meiga, carinhosa, companheira, atenciosa, mas sobretudo, uma pessoa amiga! Você é ÚNICO, Zé! Te adoro!!!!!!!!!!!!!!

Edélvio (Del): uma figura de pessoa! Sempre acreditou que eu fosse conseguir. Obrigada!

Aos amigos e funcionários do Departamento de Antibióticos: Orlando, S. Zeca, Fátima, Dani, Danilo, **Rita**, Tati, Gláucia, Cíntia, Adriana, adorei ter conhecido vocês! Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Probióticos e promoção do crescimento	11
2.2. Funções metabólicas, tróficas e protetoras da microbiota intestinal	16
2.3. Relações entre a microbiota intestinal, histologia do intestino e sistema imune	19
2.4 <i>Zymomonas mobilis</i> : Características bioquímicas ecológicas e terapêuticas	24
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Microrganismos	31
4.2. Animais	32
4.3. Delineamento experimental	33
4.3.1. Experimento 1	35
4.3.1.1. Evolução do ganho de peso e consumo de ração	35
4.3.2. Experimento 2	37
4.3.2.1. Avaliação leucocitária total e diferencial	37
4.3.2.2. Histologia da mucosa intestinal, fígado e baço	37
4.3.2.3. Translocação bacteriana para o sangue	38
4.3.2.4. Determinação de <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Zy,momonas mobilis</i> nas fezes	38
4.3.2.5. Análises estatísticas	41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Experimento 1	44
5.1.1. Evolução ponderal dos ratos	44
5.2. Experimento 2	49
5.1.2. Avaliação leucocitária total e diferencial	49
5.1.3. Estudo histopatológico	52
5.1.4. Translocação bacteriana	54
5.1.5. Avaliação da microbiota intestinal, quanto à contagem de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i>	56
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

FIGURA 1- Contagem de células viáveis do fermentado de <i>Zymomonas mobilis</i>	32
FIGURA 2- Distribuição dos grupos experimentais	33
FIGURA 3- Determinação de <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i> presentes nas fezes de ratos Wistar	40
FIGURA 4- Ingestão alimentar de ratos tratados e controles	47
FIGURA 5- Média do ganho de peso de animais tratados e controles	48
FIGURA 6- Enumeração de <i>Escherichia coli</i> nas fezes de ratos tratados e controles	58
FIGURA 7- Enumeração de <i>Enterococcus</i> nas fezes de ratos tratados e controles	58

TABELAS

TABELA 1 - Score de características gerais de aparência e saúde dos animais	36
TABELA 2 - Contagem de leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico dos animais tratados com <i>Zymomonas mobilis</i>	49
TABELA 3 - Contagem de leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico dos animais controle	50

RESUMO

Devido ao aumento na necessidade de uma vida saudável, novas alternativas não farmacêuticas vêm surgindo visando à prevenção e promoção da saúde da população. Neste sentido, grande ênfase tem sido dada à descoberta de novos microrganismos com atributos de probióticos que, no caso de *Zymomonas mobilis*, pode-se considerar a sua capacidade antagônica contra microrganismos patogênicos, comprovada por estudos *in vitro*. É de relevância o seu estudo *in vivo*, a fim de observar possíveis efeitos em parâmetros clínicos, hematológicos, bacteriológicos e histológicos em ratos Wistar, mantidos sob condições convencionais. Aleatoriamente, os animais foram distribuídos em dois grupos: tratado, aquele em que os animais foram submetidos a uma concentração de *Zymomonas mobilis* na concentração de 10^9 UFC/mL/rato/dia; e controle, que receberam água, ambos via gavagem, por um período de 30 dias. Por todo o período experimental, foram monitorados a evolução do ganho de peso, consumo de ração e características gerais de saúde dos animais. Para a avaliação dos parâmetros hematológicos, foi coletado 10mL de sangue, via punção cardíaca, destinado à avaliação leucocitária total e diferencial. Quanto às análises microbiológicas, foram coletados 100mg de fezes, necessários à contagem de *Escherichia coli* e *Enterococcus*. Os parâmetros hematológicos e bacteriológicos foram realizados em dois momentos: antes (T0) e após a aplicação com a referida bactéria (T30), para ambos os grupos. Decorrido o período de 30 dias, os animais foram sacrificados para a retirada de seu intestino, fígado e baço, a fim de serem avaliados histologicamente. Por fim, foi averiguada a capacidade de haver translocação para o sangue das bactérias *Zymomonas*, *E. coli* e *Enterococcus*. Os resultados demonstraram que a ingestão de *Zymomonas mobilis*, após um período de 30 dias, não influenciou no ganho de peso dos animais; não causou alteração morfológica qualitativa entre os grupos experimental e controle, evidenciado pelo estudo histológico do fígado, baço e intestino, não alterou a contagem total e diferencial de leucócitos e não promoveu translocação bacteriana para o sangue. Entretanto, alterações foram observadas no comportamento da microbiota intestinal, que evidenciou diferença apenas para a contagem de *Escherichia coli*. Diante disso, pode-se concluir que *Zymomonas mobilis* comportou-se como uma bactéria não-patogênica e não-tóxica, podendo, pois, ser segura ao consumo.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, probiótico, ratos.

ABSTRACT

Due to the increase need of health life, new no-pharmacologic alternatives is growing up aiming the prevention of diseases and to benefit health in the World. In this way greater emphasis, had been done to obtain new microorganisms with probiotic attributes, which in *Zymomonas mobilis* may be regarding his antagonic capacity against pathogenic microorganisms, comproved by 'in vitro' studies. The condition of 'in vivo' studies are very important to observe possible effects in clinic, haematologic, bacteriologic and histologic parameters. Wistar rats were maintained under conventional conditions, randomized in two distinct groups: 1 – treated – rats submitted to *Z. mobilis* (10^9 UFC/mL/rat/day); 2 – treated rats receiving water (both for gavage), by 30 days. During the experimental period the rats were weighted and general characteristics of animal health. To evaluate the haematologic parameters, blood was collected (1 mL/rat), by cardiac puncture, and determined total and differential leucocytes. Fecal material (100mg) were collected to *E. coli* and *Enterococcus* analysis. The haematological and bacteriological parameters were realized in two periods: before microbial application (T0) and after application (T30), for both groups. After the 30 days period the animals were sacrificed for extraction of intestine, liver and lien organs, for histological evaluation. The possibility of bacterial translocation (*Zymomonas*, *E. coli* e *Enterococcus*) to animal blood was observed. The results demonstrated that *Zymomonas mobilis* after period of 30 days did not influence the weight gain of animals; did not cause qualitative morphological changes between control and experimental groups, it was evidenced by histological study of liver, spleen and gut, it did not promote bacterial translocation toward the blood and it did not promote alterations in the total and differential leukocyte count. However, there were alterations in the behavior of intestinal microbiota, which has been evidenced a difference in the *E. coli* count. In this sense, it can be conclude that *Zymomonas mobilis* is an non-pathogenic and non-toxic bacterium according to its behavior, therefore, it is secure for consume.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, probiotic, rat.

Introdução

1. Introdução

As funções primárias do trato gastrintestinal eram simplesmente a de digerir alimentos, absorver nutrientes e excretar produtos finais não aproveitados. Todavia, atualmente tem sido considerado que o trato gastrintestinal realiza muitas outras funções que são essenciais ao bem-estar do indivíduo, tendo a microbiota intestinal um papel relevante (McNaught, MacFie, 2001).

A microbiota possui uma atividade metabólica global semelhante a de um fígado, podendo portanto ser considerada como um órgão responsável pelo desenvolvimento de funções benéficas aos animais e ao homem. A ‘proteção ecológica’ (que impede a multiplicação de microrganismos patogênicos), a ‘imunomodulação’ (que permite resposta rápida e adequada do sistema imune a agressões infecciosas) e a ‘contribuição nutricional’ (que regula a fisiologia digestiva e fornece vitaminas e energia) são as principais funções da microbiota do trato digestivo (Nicoli, Vieira, 2000).

Entretanto, em situações de estresse, as bactérias indesejáveis encontram um ambiente propício para se estabelecerem, levando a uma quebra da simbiose entre a microbiota desejável e o animal (Mulder, 1991), além de gerar um decréscimo da eficiência alimentar e conseqüentemente na taxa de crescimento dos animais (Canalli et al, 1996).

Como forma de reprimir estes microrganismos indesejáveis, aumentar a eficiência de conversão alimentar e promover o crescimento, extensivos usos de antibióticos em animais de corte vem sendo visto. No entanto, esta medida tem gerado

um desequilíbrio da flora intestinal (Pascual et al, 1999), ao desenvolvimento de resistência bacteriana, com o aparecimento de cepas resistentes (Dafwang, Bird, Sunde, 1984), e à alta toxicidade crônica (Dundas et al. *apud* Shu, Gill, 2002).

Mediante essas premissas e considerando o interesse cada vez mais crescente da população em ter uma vida saudável, novas alternativas não farmacêuticas vem surgindo visando à prevenção e promoção da saúde (Tagg, Dierksen, 2003). Neste sentido, grande ênfase tem sido dada aos probióticos, que são microrganismos benéficos à saúde, capazes de restaurar a microbiota intestinal, promovendo o seu equilíbrio (Fuller, 1989), e podem ser bactérias, fungos ou leveduras (Hart, Stagg, Kamm, 2003).

Os organismos probióticos são classificados como GRAS – General Recognized As Safe (Saxelin et al, 1996). Portanto, o status de GRAS de novos organismos isolados sem nenhuma história prévia deve ser cautelosamente assegurado por meio de estudos seguros usando animais-alvo (Goldin, 1998), antes de serem oferecidos ao consumo (Collins, Thornton, Sullivan, 1998; Huang, Kotula, Adams, 2003).

Em linhas gerais, os métodos que podem ser usados para assegurar a inocuidade de uma cepa de probiótico devem incluir estudos sobre: a) as propriedades intrínsecas da cepa; b) sua farmacocinética e c) as interações existentes entre a cepa e o hospedeiro (Saarela et al., 2000). Análises de toxicidade de órgãos, por meio do estudo histopatológico, função imune e translocação bacteriana, são também usados com frequência em roedores na avaliação dos probióticos (Salminen et al., 1998; O'Brien et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Zymomonas mobilis, bactéria gram-negativa na forma de bastonetes curtos e grossos, foi isolada primeiramente por Barker e Hillier em 1911, quando eles estudavam

a ‘doença da sidra’. Eles acreditaram ser ela o microrganismo responsável pelo ‘flavour’ de sidra estragada (Swings e De Ley, 1977).

A principal característica bioquímica de *Zymomonas* está na sua capacidade de produzir etanol, além de sorbitol e levanas (Snoep et al, 1996). Entretanto, além de apresentar essas alternativas em potencial para a indústria, *Zymomonas mobilis* vem se destacando também por suas diversas aplicações terapêuticas.

Foi verificado que a ingestão de preparações líquidas de *Zymomonas* no tratamento de certas infecções entéricas (Gomes, 1959; Gonçalves de Lima et al, 1970) e urogenitais (Wanick et al, 1970; Wanick e Silva, 1971; Souza e Souza, 1973) promovia resultados promissores, além de possuir propriedades anti-tumorais (Calazans et al, 2000). Foi demonstrada ainda, *in vitro*, a atividade antagonista de *Zymomonas* mediante patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, por meio da produção de bacteriocinas (Lima, 2002).

Com base nesses dados, torna-se relevante o estudo *in vivo* para avaliar os efeitos da ingestão de *Zymomonas mobilis* sobre parâmetros clínicos, imunológicos e bacteriológicos, bem como na promoção do crescimento, em ratos Wistar mantidos sob condições convencionais.

Revisão de literatura

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. Probióticos e promoção do crescimento

O estabelecimento de uma população microbiana em animais de sangue quente logo após o nascimento é inevitável. A microbiota intestinal dos frangos de corte e outros animais tem um papel importante na digestão e absorção dos alimentos ingeridos, exercendo, dessa forma, influência sobre a sua saúde e produção (Canalli et al, 1996).

Os microrganismos intestinais também aumentam a necessidade de nutrientes pelo hospedeiro, devido a um aumento na frequência de reposição da mucosa, bem como por competirem com o hospedeiro por uma parte da dieta (Milles et al 1989 *apud* Canalli et al., 1996). Ainda, conforme Walton (1990), citado por Zuanon et al. (1998), a atividade bacteriana intestinal acarreta diminuição no desempenho animal, pela produção de substâncias tóxicas, o que determina o espessamento da parede intestinal e causa menor utilização de nutrientes. E por fim, em situações de estresse, as bactérias indesejáveis têm a oportunidade de prevalecer, o que leva a um decréscimo nas taxas de crescimento e produção animal (Canalli et al, 1996).

Há poucas décadas, o método mais comumente utilizado para reprimir os microrganismos indesejáveis era o tratamento com agentes antibacterianos, com o objetivo também de promover o crescimento (Pollmann, Danielson, Peo, 1980). Os promotores de crescimento, segundo Zuanon et al (1998), adicionados às rações, agem diminuindo a população de patógenos, bem como a produção de toxinas por microrganismos indesejáveis, além de suprimir o número de células inflamatórias em decorrência de uma resposta imunológica menos intensa.

Entre as substâncias mais empregadas como promotoras de crescimento estão os antibióticos, que representam um grupo de compostos com estrutura química heterogênea e com propriedades físico-químicas e espectro de ação diferentes, tendo como único ponto comum a capacidade antimicrobiana (Jong et al., 1985).

Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos pela medicina veterinária e humana (Mattila-Sandholm, Matto, Saarela, 1999), vem gerando questionamentos acerca dos possíveis perigos aos humanos, via cadeia alimentar, a citar: 1) reações alérgicas aos antimicrobianos; 2) resíduos de drogas nos alimentos e 3) aumento da resistência à droga (Wilson apud Al-Ankari, Homeida, 1996). Além disso, vem sendo verificado que alguns antibióticos (ex. oxytetraciclina e sulfamidina) podem ainda causar efeito imunossupressor (Al-Ankari, Homeida, 1996).

A microbiota intestinal é composta por centenas de espécies bacterianas, as quais são conhecidas por possuírem determinantes de resistência. Tem sido especulado que a microbiota poderia funcionar como um reservatório de genes resistentes a antibióticos, sendo tal resistência transferida não somente entre os membros da flora residente, mas também por bactérias da flora transitória (Salyers, Shoemaker, 1996; Mattila-Sandholm, Matto, Saarela, 1999; Noble, Virani, Cree, 1992).

Nos EUA, são estimados de 2-4 milhões de casos anuais de salmonelose. *Salmonella* é largamente distribuída em frangos e porcos. Uma gama de produtos alimentícios tem sido implicada em surtos de salmonelose incluindo ovos, frangos, carnes, queijos e numerosos outros produtos de origem animal. E o mais desconcertante é que o nível de resistência a antibióticos é extremamente alto em animais de corte. Dados recentes indicam que, enquanto 3 milhões de antibióticos são consumidos pelos humanos, 24.6 milhões são destinados aos animais, em níveis subterapêuticos, com o

objetivo de promover o crescimento (Mellon, Benbrook, Benbrook, 2001 apud White et al, 2001). E isso vem fazendo com que anualmente venha aumentando os fracassos no tratamento de diversas infecções, devido à múltipla resistência aos antibióticos (Van der Waaij, Nord, 2000).

Além dos antibióticos, dieta e estresse também têm sido identificados como fatores capazes de afetar a saúde do animal, bem como sua performance de crescimento (Bernadeau, Vernoux, Gueguen, 2002). Diante dessas premissas, o uso de probióticos como uma possível alternativa aos antibióticos tem recebido renovado interesse nas áreas clínica e veterinária (Michelan et al., 2002).

A definição mais comumente utilizada para probiótico é “um suplemento alimentar microbiano vivo que benéficamente afeta o animal hospedeiro por promover um balanço microbiano intestinal”. Tal definição tem sido desde então estendida à saúde humana como “microrganismos não patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva sobre a saúde ou a fisiologia do hospedeiro” (Marteau et al., 2001).

Os probióticos podem ser bactérias – mais comumente as produtoras de ácido láctico, como os lactobacilos, bifidobactérias e estreptococcus – ou fungos, como *Saccharomyces boulardi* (Hart, Stagg, Kamm, 2003).

A base teórica para a seleção de um probiótico inclui propriedades de segurança, funcionais e tecnológicas. No que se refere à segurança, as cepas de probióticos para uso em humanos devem preferencialmente ser da mesma origem e não podem causar patogenicidade e/ou toxicidade. Quanto aos aspectos funcionais, elas devem ser resistentes ao suco gástrico, aderentes à superfície da mucosa intestinal, possuir

atividade antagonista contra patógenos, bem como propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas. Considerando o fator tecnológico, são relevantes as seguintes características: bons atributos sensoriais, viabilidade durante o processamento, além de estabilidade no produto durante a estocagem (Saarela et al., 2000). Entretanto, segundo Ouwehand et al., (1999), um microrganismo para ser considerado probiótico não necessariamente precisa atender a todos esses critérios.

Para se alcançar a maior parte desses efeitos, os probióticos agem por exclusão competitiva, aderindo a sítios específicos localizados no epitélio intestinal diminuindo, dessa maneira, a colonização por microrganismos patogênicos (Jin et al., 1997), como também essa adesão provê uma interação com a superfície da mucosa, promovendo o contato com o tecido linfóide associado ao intestino, mediando efeitos imunes sistêmicos e locais (Saarela et al., 2000).

Muito embora a implantação de cepas de probióticos à superfície da mucosa e a subsequente colonização no trato gastrintestinal tenha sido sugerido ser um dos pré-requisitos para a ação do probiótico (Gismondo, Drago, Lombardi, 1999), Hargrove e Alford (1978), verificaram que os microrganismos *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, mesmo quando ausentes no intestino, promoveram resposta positiva ao crescimento. Por outro lado, *Lactobacillus acidophilus* foi implantado e nenhum efeito significativo sobre o crescimento foi observado.

Os mecanismos por completo não estão totalmente esclarecidos, entretanto, mediante algumas pesquisas já realizadas, pode-se levantar algumas formas de atuação dos probióticos (Jin et al., 1997):

- No intestino, eles realizam uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por conseqüência, impedindo a proliferação destes;
- Através da produção de ácidos orgânicos, provoca uma redução no pH intestinal, tornando o meio impróprio para a multiplicação de agentes patogênicos;
- Secretam proteínas (bacteriocinas) que têm uma ação inibitória ou destrutiva contra uma cepa específica de bactéria;
- Reduzem a atividade enzimática bacteriana (Gorbach, 2000).

Os ácidos orgânicos incluem o lático e o acético, que juntamente com peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono, representam as substâncias antimicrobianas mais largamente produzidas pelos probióticos. Se estes organismos forem metabolicamente ativos durante a passagem pelo trato intestinal, algumas dessas substâncias serão produzidas. As indicações disto vêm de estudos que demonstram que o consumo de cepas de probióticos reduzem o pH fecal, indicando, pois, a produção de ácidos orgânicos. A produção de outras substâncias antimicrobianas como diacetil, ácido piroglutâmico e especialmente bacteriocinas, não tem sido relatada sob condições *in vivo* (Ouwehand *et al.*, 1999).

2.2. Funções metabólicas, tróficas e protetoras da microbiota intestinal

Há um século, foi sugerido que os microrganismos possuíam também a capacidade de prevenir e tratar doenças, além de suas funções milenares na fermentação de alimentos e bebidas. Entretanto, somente há algumas décadas que se tem dirigido atenção especial à microbiota intestinal, por suas funções colônicas que afetam a nutrição e a saúde animal e humana.

Muitos fatores afetam a composição da microbiota, incluindo a idade, susceptibilidade a infecções, requerimentos nutricionais e estado imunológico do hospedeiro, como também o pH, tempo de trânsito, interação entre os componentes da flora e a presença e disponibilidade de material fermentável na luz intestinal (Collins, Gibson, 1999).

Em diferentes regiões do trato gastrointestinal estão presentes grupos específicos de microrganismos, que são capazes de produzir uma grande variedade de compostos que têm diversos efeitos na fisiologia intestinal, assim como outras influências sistêmicas, bem como produzir enzimas que podem atuar metabolicamente no intestino, na conversão de substâncias em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro (Mitsuoka, 1992).

O estômago e o intestino delgado contêm poucas espécies bacterianas aderentes ao epitélio e algumas outras no trânsito. A escassez de bactérias no intestino delgado se deve à composição do meio luminal (ácido, bile, secreção pancreática), que destrói a maior parte dos microrganismos ingeridos, além ainda da atividade motora propulsiva a partir do segmento final do íleo, impedindo a colonização de bactérias no lúmen. Do contrário, o intestino grosso contém um ecossistema microbiano complexo e dinâmico

com altas densidades de populações microbianas, alcançando concentrações de 10^{11} - 10^{12} células/g de conteúdo luminal (Simon, Gorbach, 1984).

Os microrganismos residentes no cólon proximal estão em contato com nutrientes dietéticos em abundância e crescem a uma taxa rápida, causando um decréscimo no pH como resultado de uma intensa produção de ácidos graxos de cadeia curta. No lado esquerdo, o cólon distal, contudo, a disponibilidade de substrato é baixa, as bactérias crescem em nível mais lento e o pH se aproxima mais da neutralidade (Cummings et al., 1987). Logo, é verificado um alto grau de heterogeneidade dentro deste ecossistema.

A microflora do intestino grosso é adquirida ao nascer. Inicialmente, anaeróbios facultativos são os dominantes. A flora fecal de recém-nascidos amamentados ao peito é dominada por bifidobactérias. Do contrário, além destas, há a presença de bacteroides, clostridio e estreptococos, todos sendo prevalentes. Após o desmame, a configuração da microflora se assemelha a de um adulto (Ducluzeau, 1993 apud Salminen et al, 1998).

Pesquisas com animais 'germ-free' (isento de germes) têm oferecido importantes informações acerca dos efeitos da população microbiana intestinal sobre o hospedeiro. A partir desses estudos, pode-se sugerir que a microbiota tem importantes e específicas funções metabólicas, tróficas e protetoras.

Como funções metabólicas, pode-se dizer que embora esteja envolvida na síntese de vitaminas, especialmente B e K (Mitsuoca 1992), o principal papel da microflora intestinal é aproveitar a energia de carboidratos não digeridos pelo intestino, por meio da fermentação. Os maiores substratos para a fermentação são os carboidratos dietéticos que não sofreram o processo de digestão e absorção. Estes incluem celulosas,

pectinas, gomas e oligossacarídeos não digeríveis. O produto metabólico final é a geração de ácidos graxos de cadeia curta (Guarner, Malagelada, 2003). Proteínas e aminoácidos podem também ser efetivos como substratos para o crescimento de bactérias colônicas. Esses incluem elastina, colágeno e albumina, bem como proteínas oriundas da lise de outras bactérias (Cummings et al., 1997). Muito embora o metabolismo anaeróbio de peptídeos e proteínas (putrefação) pela microflora também produza ácidos graxos de cadeia curta, paralelamente são geradas uma série de substâncias, potencialmente tóxicas, incluindo amônia, aminas, fenóis, indóis e tióis (Smith, Macfarlane, 1996).

Há mais de um século, foi sugerido por Metchnikoff que algumas bactérias intestinais são benéficas à saúde, enquanto outras podem ser prejudiciais. Efeitos patogênicos incluem diarreia, infecções, carcinogênese e putrefação intestinal; como benéficos, podemos citar a inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estimulação da função imune, redução dos problemas de distensão intestinal (flatulências), aumento da digestibilidade e da absorção de nutrientes essenciais, síntese de vitaminas (Gibson, Roberfroid, 1995), produção de ácidos orgânicos que podem ser utilizados pelo corpo como fonte de energia, e ainda exercem, no intestino, o papel modulador no sistema imune, que discrimina entre bactérias invasoras das não-hostis (Abott, 2004).

Bactérias benéficas correspondem principalmente às bifidobactérias e lactobacilos. Sua predominância nas fezes de recém-nascidos faz-nos pensar que provê proteção contra infecção. Em adultos, elas podem ser as principais espécies responsáveis pela função barreira e pela estimulação da função imune em indivíduos saudáveis. Além disso, as bactérias agem em simbiose com o hospedeiro por meio da fermentação (Salminen et al., 1998).

Contudo, em virtude de algumas bactérias que vivem no cólon serem malélicas ao organismo, a colonização microbiana do intestino por bactérias benéficas (probióticos) tem um importante papel na manutenção da saúde (Kopp-Hololihan, 2001). Probióticos são produtos biológicos atrativos que produzem efeitos benéficos à saúde humana. Todavia, seus mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos, havendo ainda muita discussão sobre a relação dose/efeito, posologia e resistência antimicrobiana (Gismondo, Drago, Lombardi, 1999).

A microflora colônica, portanto, é um complexo ecossistema de microrganismos e suas funções são uma conseqüência de atividades combinadas dos componentes microbianos. Sua manipulação, por conseguinte, oferece o potencial para prover benefícios à saúde, por meio de uma variedade de mecanismos.

2.3. Relações entre a microbiota intestinal, histologia do intestino e sistema imune

As interações entre a flora comensal gastrintestinal e o hospedeiro tomam lugar ao longo das superfícies mucosas. A mucosa gastrintestinal compreende uma área muito extensa dentro do organismo, com uma simples camada de células epiteliais separando os conteúdos do lúmen intestinal do meio interno (Shanahan, 2002).

As superfícies mucosas do organismo são sítios por meio dos quais ocorrem trocas de nutrientes e gases essenciais para a sobrevivência (Clare, Huett, Doughan, 2002). Como conseqüência dessa demanda fisiológica e à exposição ao ambiente, células eucarióticas associadas a essas mucosas estão sempre vulneráveis ao ataque por microrganismos patogênicos. Estes têm desenvolvido mecanismos para atacar e invadir

as superfícies mucosas, enquanto o sistema imune, por sua vez, trabalha para conter essas ameaças constantes (Czerkinsky et al., 1999), contando com componentes inatos e adaptativos (Kagnoff, Eckmann, 1997).

Por representar um portal de entrada aos patógenos, a mucosa intestinal constitui o principal sítio de iniciação dos processos infecciosos (Blum et al., 1999). Os mecanismos de defesa do hospedeiro, em nível intestinal, compreendem sistemas que envolvem a microflora endógena e respostas imunes inatas e adaptativas (Vaughan, Mollet, de Vos, 1999).

As respostas imunes inatas representam a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos. Bactérias residentes entéricas podem ser consideradas como componentes da imunidade inata. Um ecossistema saudável pode prevenir o estabelecimento de microrganismos oportunistas, por meio da competição por nutrientes, repressão direta pela produção de bacteriocinas, interferência com sinais imunes etc (Neish, 2002; Lu, Waker, 2001).

Compreendendo a imunidade inata estão as barreiras físicas, células fagocitárias (ex. macrófagos), eosinófilos, uma classe de linfócitos chamados de células matadoras naturais (*Natural Killer – NK*) e várias moléculas originadas no sangue. Essas células possuem a capacidade de reconhecer microrganismos patogênicos, bem como moléculas (lipopolissacarídeo, peptidoglicano) por meio de seus receptores específicos. Células fagocíticas têm um papel central na doença contra as infecções microbianas, enquanto as células NK agem na defesa contra infecções virais e câncer (Gill, 2003).

No que se refere à resposta imune específica, as células B e T do hospedeiro localizam-se em sítios indutores para o desenvolvimento da imunidade da mucosa –

placas de Peyer, folículos linfóides – e sítios efetores no intestino – lâmina própria, leucócitos intra-epiteliais (Jiang et al., 2004). As células B correspondem à imunidade humoral (produção de anticorpos) e as células T representam a imunidade mediada por células (linfócitos T).

A linfoproliferação é comumente examinada quando se deseja analisar a eficácia de uma terapia imunossupressora ou imunoestimulante, quando se testam substâncias químicas para averiguar seu potencial imunotóxico ou quando se monitoram falhas imunológicas ou congênitas (Kirjavainen et al., 1999).

Antes da evolução dos vertebrados, a defesa do hospedeiro contra invasores estranhos era, em grande parte, mediada pelos mecanismos da imunidade natural. A imunidade específica, consistindo de linfócitos e seus produtos secretados, os anticorpos, apareceu nos vertebrados. Todavia, a fim de executar sua função de defender o hospedeiro por eliminação de antígenos estranhos, tanto os linfócitos quanto os anticorpos precisam da participação dos fagócitos e do complemento, que constituem a imunidade natural. Tem sido proposto, inclusive, que o sistema imune inato vem sendo preservado ao longo da evolução não apenas para controlar as infecções, mas, sobretudo para alertar a imunidade adaptativa contra a presença de patógenos (Medzhitov, Preston-Hulburt, Jeneway Jr, 1997).

Como forma de otimizar as respostas imunes específicas, a maioria dos linfócitos, fagócitos mononucleares e outras células acessórias estão localizadas em tecidos ou órgãos, que também são os locais para onde os antígenos vão ser transportados e concentrados. Os tecidos linfóides podem ser classificados em dois grupos: órgãos centrais (medula óssea e timo) e órgãos periféricos (linfonodos, baço, tecidos linfóides associados às mucosas e o sistema imune cutâneo) (Calich, Vaz, 2001).

A resposta imune das mucosas é provavelmente o mecanismo mais elucidado de defesa contra enteropatógenos. Os sítios indutores tomam lugar nos agregados linfóides, que são cobertos por um epitélio especializado que contém células M, as quais têm a capacidade de se ligar e transportar antígenos, para posterior apresentação aos linfócitos (Neutra, Frey, Kraehenbuhl, 1996). Os linfócitos, por sua vez, estão agregados em folículos que contém compartimentos de células B e T, representando os mediadores das respostas humoral e celular, respectivamente (Blum et al., 1999).

A imunidade humoral é o principal mecanismo de defesa contra micróbios extracelulares e suas toxinas secretadas, visto que os anticorpos podem se ligar a eles e auxiliar na sua destruição. Ao contrário, micróbios intracelulares obrigatórios, como os vírus e algumas bactérias, proliferam no interior das células do hospedeiro, tornando inacessível o acesso dos anticorpos circulantes. A defesa contra tais infecções deve-se à imunidade celular, que funciona induzindo e promovendo a destruição intracelular dos microrganismos ou a lise das células infectadas (Calich, Vaz, 2001).

Uma característica marcante dos mecanismos protetores da mucosa intestinal é a capacidade de discriminar entre elementos luminiais não-patogênicos (alimentos, bactérias comensais) e antígenos derivados de enteropatógenos (Blum et al., 1999).

Esta relação entre o sistema imune e a microflora do hospedeiro existe numa relação de mútua dependência, representando um desafio constante para o sistema imune. Por um lado, o hospedeiro precisa evitar uma resposta agressiva a esta população microbiana (tolerância imunológica), o que poderia levar à eliminação de organismos benéficos, podendo resultar certamente em inflamação e extensivos danos aos tecidos (Sartor, Rath, Sellon, 1996). Por outro lado, precisa ser mantida a capacidade de limitar a propagação de bactérias do lúmen em direção aos tecidos

(translocação bacteriana), além de manter uma resposta imune eficaz aos patógenos intestinais (Klapproth et al., 1995; Garside, Mel, Khoruts, 1999). Neste sentido, o sistema imune da mucosa comporta-se como um órgão sensorial, detectando o perigo dentro de seu próprio microambiente, por meio de receptores (que reconhecem moléculas específicas de microrganismos como DNA, lipopolissacarídeo e flagelos) (Aizapurua, Russel-Jones, 1988), capazes não só de detectar, mas, sobretudo de memorizar informações (Shanahan, 2002).

A imunomodulação pela administração oral de microrganismos, particularmente por aqueles considerados como probióticos, tem recebido renovado interesse. Probióticos têm sido relatados como sendo capazes de modular favoravelmente tanto a imunidade adquirida quanto a inata (Dugas et al, 1999).

Foi o que observaram Nicoli e Vieira (2000), ao realizar estudos com camundongos ‘germ-free’, após a administração com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardi*. Foi verificado que os animais que receberam os probióticos combateram com mais eficiência a septicemia induzida por uma cepa patogênica de *Escherichia coli*, do que animais não-tratados com probióticos. Essa resistência é provocada pela ativação da imunidade inata, isto é, a reação do sistema imune nos primeiros dias após a infecção, antes que anticorpos e outros mecanismos de resistência específicos para o microrganismo invasor fossem ativados. Assim, nos animais tratados com probióticos, a atividade dos macrófagos (células brancas de defesa capazes de realizar a fagocitose) era maior do que nos animais não-tratados, fazendo com que *E. coli* fosse eliminada mais rapidamente. Isso pode ser comprovado pelo fato de animais ‘germ-free’ terem baixas densidades de células linfóides na mucosa, serem

pequenas as suas estruturas de folículos especializados e as concentrações de imunoglobulinas no sangue serem baixas (Tannock, 2001).

2.4. *Zymomonas mobilis*: características bioquímicas, ecológicas e terapêuticas

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, apresenta-se na forma de bastonete curto e grosso, com extremidades arredondadas, e cresce em faixas de pH que variam entre 3,4 a 7,5, apresentando temperatura ótima de crescimento entre 25° C e 30° C (Viikari, Gisler, 1986).

O primeiro isolamento de *Zymomonas mobilis* registrado na literatura foi realizado por Barker e Hillier, em 1911, quando ambos estudavam a ‘doença da sidra’. Por falta de um binômio latino para a bactéria, a descrição desses pesquisadores não foi validada. Uma década após, Lindner isolou, no México, da seiva fermentada do agave (produção do pulque), uma bactéria semelhante à de Barker e Hillier, e a descreveu como *Thermobacterium mobili*. Até que Kluver e Hoppenbrouwers, em 1931, estudaram a fermentação alcoólica produzida por *Thermobacterium mobili* e a denominaram de *Pseudomonas lindneri*. Em 1936, Kluver e Van Niel criaram o gênero *Zymomonas* e denominaram a bactéria descoberta por Lindner de *Zymomonas mobilis* (Falcão de Morais, 1982).

A principal característica bioquímica de *Zymomonas mobilis* é a sua capacidade de produzir etanol, mas também se destaca na produção de sorbitol e levana (Swings & De Ley, 1977). Levanas são polissacarídeos formados a partir de sacarose ou rafinose. O metabolismo da sacarose parece ser induzido e, a partir deste dissacarídeo, além de

etanol e dióxido de carbono, também é produzida a levana, polimerizada a partir da frutose. Células que estejam ou não em crescimento, assim como o caldo fermentado isento de células, produzem levana, pela ação de uma invertase que seria ao mesmo tempo responsável pela polimerização da frutose, denominada de levansacarase (Doelle et al., 1993).

Testes farmacológicos realizados por Calazans (1997) revelaram a ocorrência de ação anti-tumoral e imunomoduladora por parte desses polímeros de frutose (levanas) e que o percentual de inibição tumoral depende do peso molecular da levana aplicada.

Frutooligossacarídeos e levanas podem ser produzidos por *Zymomonas mobilis* em meio rico em sacarose; conseqüentemente, podem ser formados como subprodutos em destilarias que utilizam a sacarose como matéria-prima. É bem provável que ambos, frutooligossacarídeos e levanas, serão componentes de alimentos funcionais por estimular bactérias probióticas, além de agir como agentes redutores do colesterol sanguíneo (Bekers et al., 2002).

Do ponto de vista nutricional, *Zymomonas mobilis* são organismos pouco exigentes, crescem em meios contendo glicose e extrato de levedura apenas (1 a 2g/L). Apesar disso, não são microrganismos fáceis de serem isolados, pois sempre se encontram ao lado das leveduras e de outros organismos sacarófilos comuns, como *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* etc (Falcão de Moraes et al, 1982).

Caracterizar *Zymomonas mobilis* como um agente terapêutico deve-se, em grande parte, à sua atividade antagônica, cujas propriedades fermentativas são similares aos fungos alcoólicos. Foi então sugerido que *Zymomonas mobilis* era um microrganismo correspondente aos agentes de fermentação láctica, capazes de modificar

a população microbiana intestinal, inibindo o desenvolvimento da flora putrefativa (Gonçalves de Lima, Schumacher, Araújo, 1972).

Falcão de Moraes (1982) cita que estirpes de *Zymomonas mobilis* têm sido encontradas em ambientes açucarados os mais diversos, tais como vinhos de maçã e de pêra, na Europa; seiva do agave fermentado (pulque), no México; cerveja deteriorada, nas ilhas britânicas; seivas de palmas diversas, na África, Ásia e Américas; e caldo de cana fermentado, no Brasil. Nessas fermentações, *Zymomonas mobilis* se encontra ao lado de leveduras e bactérias como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, o que dificulta bastante o seu isolamento em cultura pura.

Com um único relato na literatura científica, que constitui o isolamento de *Zymomonas mobilis* da bebida fermentada derivada do agave (aguamiel), Lindner em 1926 faz alusão às inter-relações entre a microflora, com predominância de fungos, causada pela acidificação artificial do meio com ácido tartárico, competindo com *Zymomonas mobilis*, que não tolera a concorrência de alguns agentes existentes nessas populações microbianas (Gonçalves de Lima, Schumacher, Araújo, 1972). Lindner afirmava que a fermentação é o meio mais simples de combater a putrefação. Logo, a descoberta de um microrganismo que produz uma fermentação tão potente, leva a sugerir o seu emprego na prática clínica, especialmente em supurações e infecções intestinais (Gonçalves de Lima, Schumacher, Araújo, 1972).

Com a finalidade de observar o comportamento de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* frente a pacientes que apresentam infecções genitais, foi realizado um estudo por Wanick e Silva (1971), que utilizaram duas formas de aplicação de *Zymomonas mobilis*: líquida ou sob a forma de geléia. Foi verificado que o tempo médio de cura foi

mais curto nos pacientes submetidos à aplicação com geléia (12 dias), por haver maior retenção *in loco*, do que o tratamento sob a forma líquida (15 dias).

O efeito antagônico de *Zymomonas mobilis* sobre *Escherichia coli*, *Haemophilus vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas mobilis* e *Staphylococcus aureus* foi mostrado por Souza e Souza (1973), ao inocularem em pacientes portadores de colpíte e vulvovaginite tampões vaginais impregnados de *Zymomonas mobilis* sob a forma de geléia. Os tampões eram substituídos a cada 24 h e em média a duração do tratamento foi de 6-10 dias, com obtenção de resultados significativos, a citar a recuperação da coloração normal da mucosa vaginal e o desaparecimento dos sintomas clínicos.

Lopes et al. (1980) avaliaram os efeitos obtidos ao empregar *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em pacientes com enterocolite bacteriana, após ingestão de 150 mL e 300 mL, divididos em três respectivas doses diárias de 50 mL e 100 mL, por um período de 10 dias. Foram feitas coproculturas antes e depois do tratamento. Mediante os resultados, foi observado uma melhora na sintomatologia durante o tratamento e erradicação da bactéria.

Santos (2002), objetivando esclarecer um dos possíveis mecanismos de ação de *Zymomonas mobilis*, realizou um estudo a fim de verificar seu efeito imunoestimulante, por meio da produção de citocinas humanas '*in vitro*'. Foi verificado que a cultura de *Zymomonas mobilis* na concentração de 10^9 UFC / mL foi mais efetiva na promoção de efeitos imunoestimulantes, do que quando administrados levana ou o filtrado de células, levando a sugerir a necessidade de viabilidade celular para a observação desses efeitos.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da ingestão de *Zymomonas mobilis* sobre parâmetros hematológicos, histopatológicos e microbiológicos em ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Monitorar o consumo de ração e a evolução ponderal dos ratos;
- Avaliar os leucócitos totais e diferenciais;
- Verificar a histopatologia do fígado, baço e intestino;
- Averiguar a ocorrência de translocação bacteriana;
- Analisar o comportamento da microbiota intestinal, quanto à contagem de *Escherichia coli* e *Enterococcus*.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de *Zymomonas mobilis* CP4 (DAUFPE 202), isolada de caldo de cana fermentado (Gonçalves de Lima et al., 1970). Esta linhagem é pertencente à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.1. Meios de Cultivo

4.1.1.1. Conservação

A linhagem de *Zymomonas mobilis* foi conservada em meio Standard de Swings & De Ley (SSDL), com a seguinte composição em g/L: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0 ágar 15g. O pH antes da autoclavagem foi ajustado para 6.5 (Swings e De Ley, 1977).

4.1.1.2. Fermentação

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 500mL, contendo 100mL de meio de produção (SSDL), utilizando-se como inóculo 10% do cultivo crescido a 30°C, por 24 horas (Lima, 2002). Incubava-se a mesma temperatura por um período de 48 h para proporcionar o processo fermentativo.

4.1.1.3. Manutenção

Zymomonas mobilis foi repicada a cada dois meses para tubos contendo meio de cultura SSDL. Os cultivos foram incubados a 30°C por 48 horas, sendo após a linhagem estocada sob refrigeração (aproximadamente 4°C).

4.1.2. Contagem de células viáveis do fermentado de *Zymomonas mobilis*

Foi realizada por meio de semeadura em meio sólido Schreder, com a seguinte composição em g/L: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $(NH_4)SO_4$ 1,0; K_2HPO_4 1,0; extrato de levedura 1,0; sacarose 20; ágar 15-20 g. Antes, contudo, foram realizadas as diluições sucessivas, conforme Figura 1.

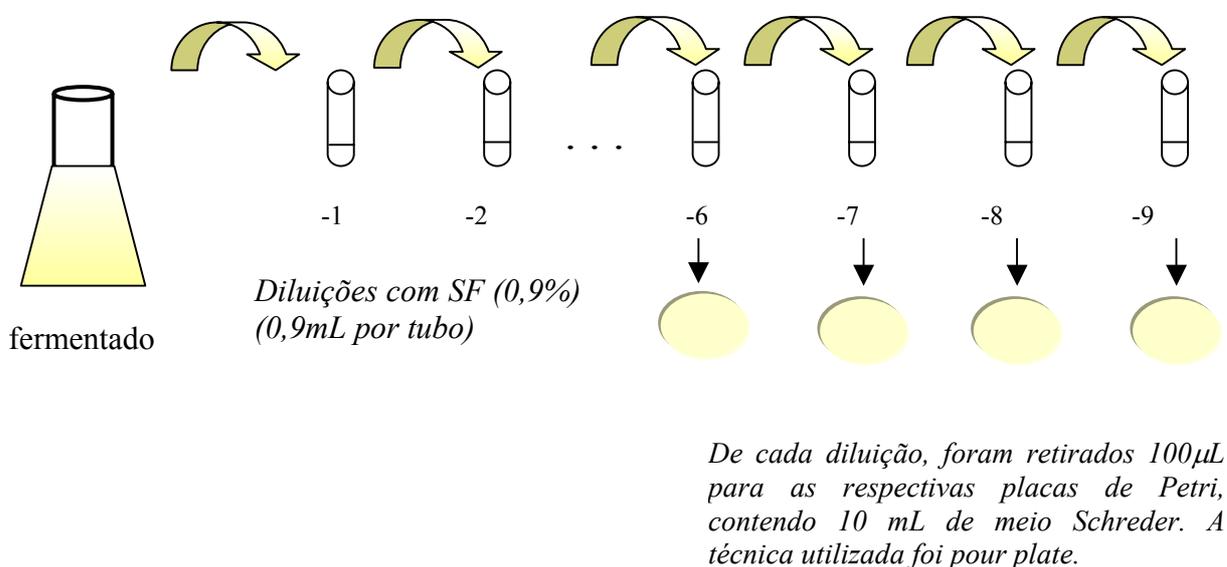


Figura 1 - Contagem de células viáveis do fermentado de *Zymomonas mobilis*

4.2. Animais

Foram utilizados ratos albinos, de ambos os sexos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), com 5 semanas de idade, desmamados aos 21 dias,

provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em número de 5 por gaiola, à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob condições padrão de iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas) (Merusse e Lapichik, 1996), tendo livre acesso à água e ração - LABINA[®].

Os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais foram de acordo com as regras estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e conforme as normas preconizadas pelo 'National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals', adotadas como critérios de avaliação pela 'Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE.

4.3. Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos com a concentração de *Zymomonas mobilis* em 10^9 UFC/ml, conforme figura 2. Cada grupo foi constituído por igual número de machos e fêmeas, distribuídos em gaiolas separadamente, sendo assim constituídos:

- **Grupo controle:** formado por ratos que receberam, via gavagem, 1 mL de água, diariamente.
- **Grupo tratado:** composto por animais que foram submetidos a dosagens diárias de *Zymomonas mobilis* na concentração de 10^9 UFC/mL (1mL/ rato/ dia).

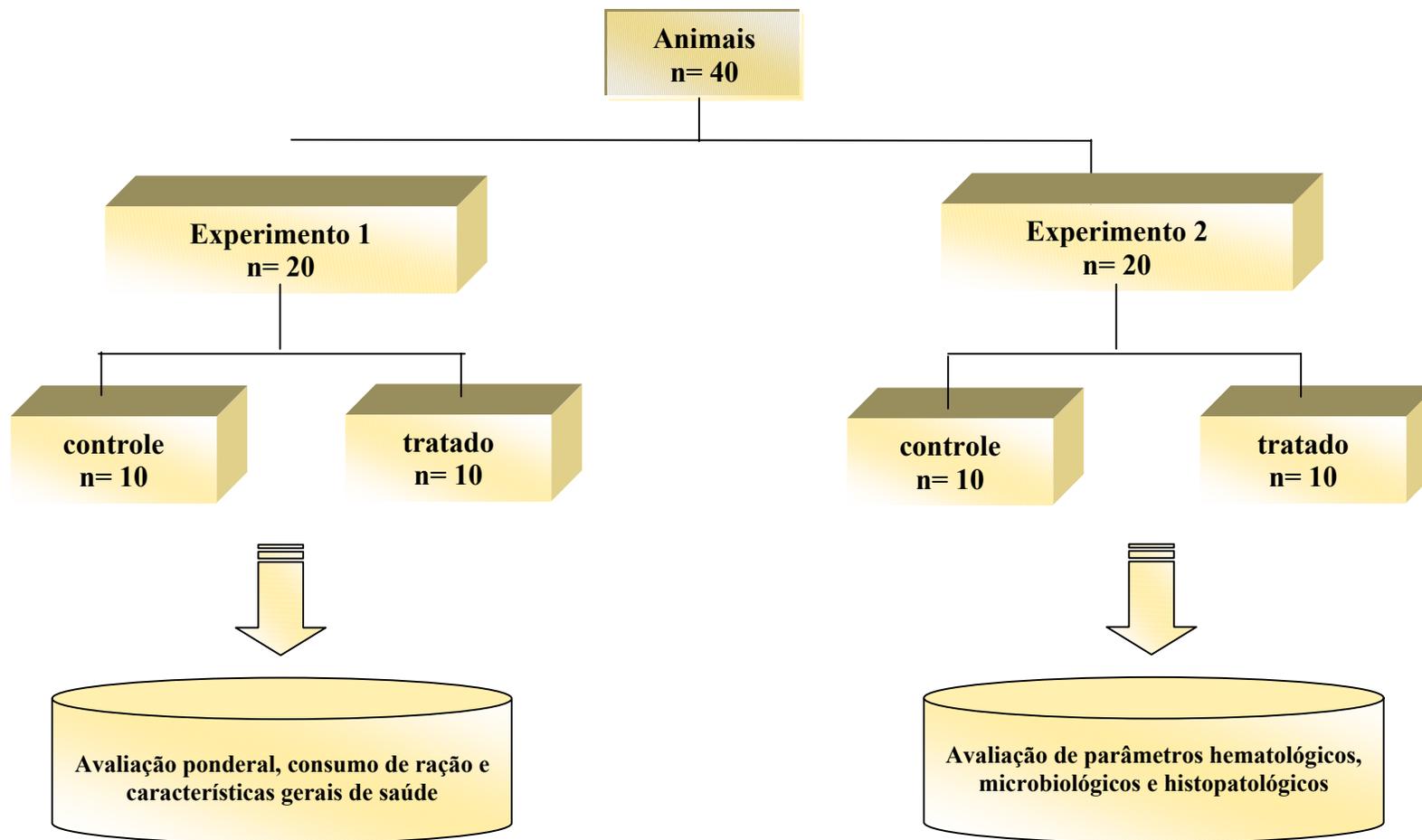


Figura 2 – Distribuição dos grupos experimentais e controles

4.3.1. Experimento 1

4.3.1.1. Evolução do ganho de peso e consumo de ração

Foi destinado à avaliação do crescimento, por meio da evolução ponderal dos ratos e sua correlação com o consumo de ração ingerida. As características gerais de saúde, utilizando um sistema de score de 1 a 5 (Tabela 1- Shu et al, 1999), e a ocorrência de diarreia foram também monitoradas.

Ambos os grupos receberam ração e água em quantidades suficientes que permitissem livre acesso (*ad libitum*). A aferição do consumo de ração foi feita semanalmente, no mesmo dia em que os ratos eram pesados. Para isso, mediante estudo piloto, era fornecida uma quantidade de 1100 g de ração, correspondente a 7 dias de consumo de 5 ratos que compunham cada gaiola. O consumo foi medido pela diferença entre a quantidade fornecida (1100 g) e as sobras existentes na gaiola. Dessa forma, foi obtido o consumo total das fêmeas ou dos machos, que dividindo-se pelo número de animais existentes na gaiola, era obtido o consumo médio de cada animal. A quantidade de água foi fornecida diariamente, devido à inexistência de um bebedouro que comportasse um volume de água semanal a ser ingerido pelos animais. Foi oferecida uma quantidade de 500 mL. Seguindo procedimento semelhante ao consumo de ração, foi obtido o consumo diário de cada animal.

Tabela 1 – Score de características gerais de aparência e saúde

Características gerais de aparência e saúde	Score
Rato com olhos brilhantes e alerta, pele macia com brilho, responde ao estímulo, demonstra interesse no ambiente.	1
Pele ligeiramente crespa, enrugada, com perda de brilho, porém o rato permanece alerta e ativo.	2
Pele crespa e enrugada, rato menos alerta e ativo, menos interessado ao ambiente, sinais de hiperventilação quando manuseados.	3
Rato arqueado, sonolento, apresentando menos interesse ao ambiente, pele crespa e enrugada.	4
Rato não reativo ao estímulo, preferindo dormir a reagir ao ambiente, patas frias ao toque, rato frio ao toque, pele totalmente enrugada.	5

Fonte: Shu et al, 1999.

4.3.2. Experimento 2

Foi destinado à avaliação leucocitária total e diferencial, histopatologia do fígado, baço e intestino, translocação bacteriana e microbiota intestinal.

4.3.2.1. Avaliação leucocitária total e diferencial

A coleta das amostras sanguíneas foi realizada em animais previamente anestesiados com éter etílico P.A. Tais amostras foram submetidas à avaliação leucocitária total e diferencial, com observações leucocitárias e plaquetárias. Para isso, foram coletados aproximadamente 1000µL de sangue, os quais foram depositados em ‘ependoffs’ de 2 mL, previamente acrescidos de uma gota do anti-coagulante Ácido-Diamino-Tetra-Acético (EDTA) a 1%.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Análises Clínicas, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, para serem realizadas às análises. Este procedimento ocorreu antes e após 30 dias da administração com *Zymomonas mobilis*.

4.3.2.2. Histologia da mucosa intestinal, baço e fígado

Após a retirada do baço, do fígado e intestino delgado efetuou-se cortes transversais nos mesmos de modo a facilitar a penetração da substância fixadora (formalina a 10% tamponada).

Após a fixação (no mínimo 48 horas), foram obtidos 3 fragmentos transversais de cada órgão, com aproximadamente 0,5 cm de espessura, de três regiões distintas.

Todos os fragmentos foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (4µm), três de cada órgão, foram obtidos por microtomia, corados com Hematoxilina-Eosina para promover as mensurações dos parâmetros morfológicos (espessura das células epiteliais, altura das vilosidades, profundidade das criptas) e analisados em microscópio óptico.

4.3.2.3. Translocação bacteriana para o sangue

Amostras de sangue (aproximadamente 1 mL) foram coletadas via punção cardíaca e cultivadas em caldo TSB por 48 horas, sendo em seguida plaqueadas sobre os seguintes meios seletivos: Ágar seletivo EMB, para análises de *Escherichia coli* e ágar ME para *Enterococcus*, Agar SLP, para *Zymomonas mobilis* (Shu et al., 1999). Para as análises de *Escherichia coli* e *Enterococcus*, procedeu-se com a técnica ‘spread plate’ (espalhamento por superfície) e para *Zymomonas mobilis*, ‘pour plate’ (por profundidade). A coleta foi realizada sobre condições assépticas.

4.3.2.4. Determinação de *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* nas fezes

Foram coletadas amostras de fezes de todos os animais (n = 20), por estimulação peristáltica, no primeiro dia do experimento (T0), ou seja, antes de haver a inoculação

com *Zymomonas mobilis*. Estas amostras foram destinadas às análises microbiológicas, para detecção de *Escherichia coli* (meio EMB) e *Enterococcus* (meio ME), segundo Waard et al. (2002). Este procedimento se repetiu aproximadamente 30 dias após a aplicação com a bactéria, incluindo além de *E. coli* e *Enterococcus*, a análise de *Zymomonas mobilis* (meio SLP), para o grupo de 10 animais que a receberam.

A coleta das fezes ocorreu sob condições assépticas, sendo as fezes depositadas sobre placas de Petri estéreis, especificamente codificadas para cada animal. De cada amostra, por meio da pesagem, foram coletados 100mg de fezes que foram homogeneizados em 900 µL de solução salina estéril, contida em tubos de ensaio. A partir daí, foram feitas as diluições sucessivas, como ilustrado na Figura 3.

Ao ágar SLP, no momento de ser distribuído nas placas de Petri, foram adicionados os antibióticos clorafenicol e penicilina, nas respectivas concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml, além do antifúngico cetoconazol, na concentração de 1000 µg/ml.

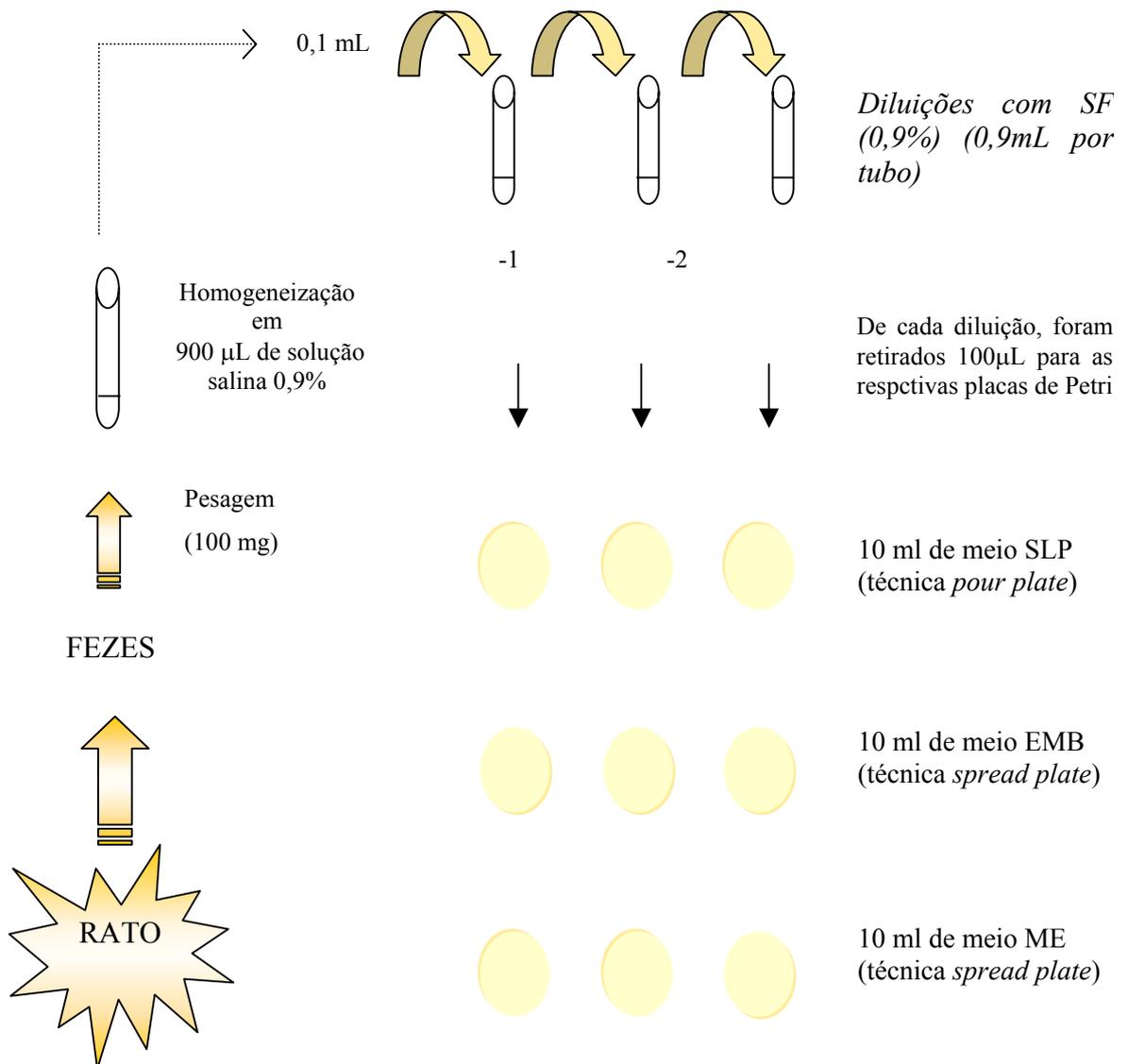


Figura 3 – Determinação de *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* nas fezes de ratos da linhagem Wistar.

4.4. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram digitados e analisados através do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 11.0. Inicialmente, utilizou-se uma análise descritiva para as variáveis quantitativa ganho de peso dos animais, consumo de ração e consumo de água por um período de 30 dias, correspondendo a uma avaliação semanal, separando-se por tratamento a que o animal foi submetido, ou seja, se recebeu *Zymomonas mobilis* (grupo tratado) ou água (grupo controle). Em seguida, esta mesma análise foi aplicada sendo que estratificada por sexo.

Posteriormente, foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA), utilizando como variável dependente o ganho de peso; como fatores fixos, o tratamento a que o animal foi submetido e o sexo; e para covariáveis foram adotados o consumo de ração e o consumo de água. Este modelo estatístico é uma combinação de análise de variância com análise de regressão.

A eliminação dos fatores e das covariáveis foi realizada usando o valor P, utilizando-se como critério para a sua manutenção no modelo o valor de $P < 0,05$. A fim de encontrar o melhor modelo, todas as variáveis foram incluídas, sendo utilizado o procedimento Backward para excluí-las do modelo. O modelo final foi escolhido com base em dois critérios: um modelo simples e com alto valor de R^2 , onde R^2 mede o quanto a variável é explicada pelo modelo.

Para as análises das contagens de bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus*, bem como dos leucócitos totais e diferenciais, foi aplicado o teste T pareado, visto que

as mensurações desses parâmetros foram feitas em dois períodos durante o experimento (antes e após a aplicação de *Zymomonas mobilis*).

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1

5.1.1. Evolução ponderal dos ratos

Foram adotados para a avaliação os seguintes parâmetros: ganho de peso, consumo de ração e monitoramento das características gerais de aparência e saúde (Shu et al., 1999).

Podemos verificar ao analisar o gráfico A (Figura 4) que o consumo de ração semanal não foi influenciado pelo tratamento a que o animal foi submetido, uma vez que suas médias não diferiram entre si ($p > 0,05$). No gráfico B (Figura 4), observa-se nitidamente um efeito relacionado ao sexo, ou seja, os machos em média consumiram ração em quantidades superiores às fêmeas, a um nível de significância de 1%.

O gráfico C (Figura 4) ilustra a comparação entre sexos e tratamentos, onde podemos verificar que a média de consumo das fêmeas não foi influenciada pelo tratamento a elas aplicado. No que se refere aos machos, a administração com *Zymomonas mobilis* (Zm) promoveu um consumo de ração superior àqueles do grupo controle.

A figura 5 (gráficos D, E e F) representa a média do ganho de peso semanal em função do tratamento (D), do sexo (E) e a interação tratamento x sexo (F). Observou-se mais uma vez um efeito relacionado ao sexo (Gráfico E), resultado este explicado pelo consumo de ração mais elevado dos machos (gráfico B, Figura 4). Muito embora tenha sido detectado um maior consumo de ração dos machos tratados com Zm em relação aos do grupo controle (gráfico C, Figura 4), este efeito não se manteve para o ganho de

peso (Gráfico F), onde se verificou que não houve diferença significativa entre suas médias ($p > 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Loddi et al. (1998), Zuanón et al. (1998) e Zhou et al. (2000).

É importante ressaltar que a promoção do crescimento resultante do uso de probiótico somente ocorre na presença de algum microrganismo depressor deste crescimento (Fuller, 1988 *apud* Canalli et al., 1996). Considerando-se isso, o efeito de probióticos sobre o crescimento apresenta-se variável.

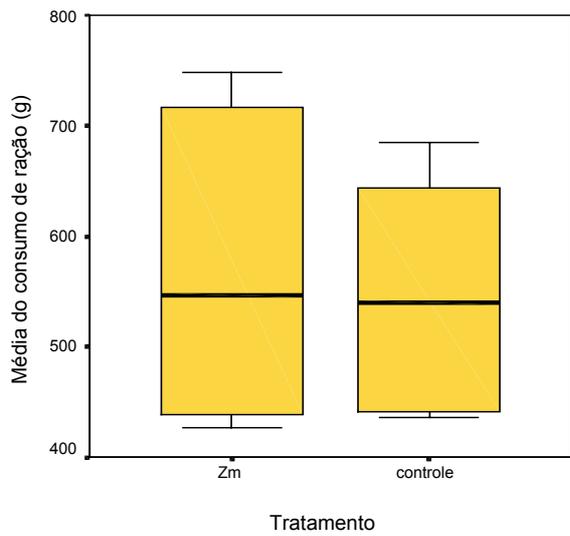
Em animais saudáveis, pouco benefício pode ser visto no uso de probióticos. Entretanto, como as chances de contaminação são amplas, a probabilidade de comprometer o desempenho animal existe, podendo ser citadas: excessivos calor, frio ou umidade; amônia; condições higiênico-sanitárias dos locais etc. Tais fatores podem reduzir os mecanismos de defesa (anticorpos) maternos e a colonização normal do intestino por organismos benéficos, conseqüentemente permitindo a colonização de patógenos durante o estágio pós-nascimento (Edens, 2003).

Vários são os fatores apontados pelos pesquisadores como os responsáveis pelos resultados conflitantes na aplicação de probióticos em animais com o objetivo de promover o crescimento. Segundo Corrêa et al. (2003), fatores como a idade do animal, tipo de probiótico, viabilidade das células, condições de armazenamento, manejo (mínimo estresse) e sanidade, podem afetar a eficácia dos probióticos. E ainda que não se tem estabelecida a proporção ideal em que devem estar as espécies bacterianas, para que sejam eficazes na promoção de benefícios como probióticos (Teshima, 2003).

Pensando nisso, alguns autores sugerem que a resposta a um determinado probiótico mais parece estar envolvida com situações de estresse negativo (Thomke, Elwinger, 1998). A comprovação desta afirmativa vem sendo mostrada em alguns

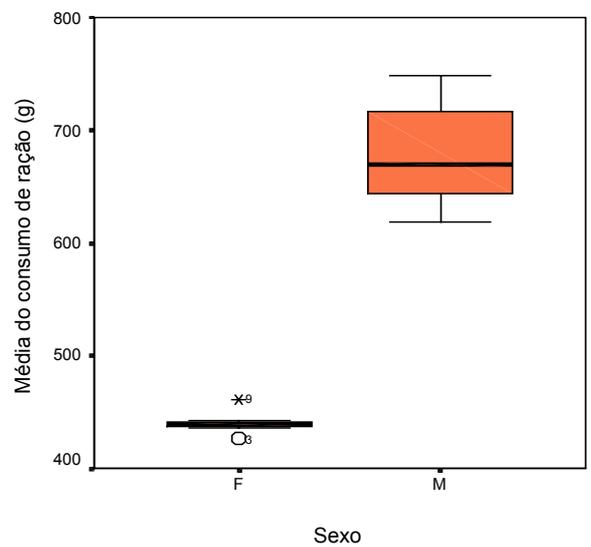
trabalhos, como o de Perdigon et al. (1995), no qual foi demonstrado que a administração com probióticos preveniu o estresse de perda de peso em animais desnutridos. Bernadeau, Vernoux, Gueguen (2002), com o mesmo propósito, realizaram uma pesquisa com camundongos que receberam dieta convencional enriquecida ou dieta hipocalórica a base de cevada, constituindo-se assim os seus grupos experimentais: 1) dieta convencional; 2) dieta convencional + *Lactobacillus*; 3) dieta hipocalórica; 4) dieta hipocalórica + *Lactobacillus*. Foi verificado que na dieta enriquecida, o probiótico nada alterou em relação ao ganho de peso, ao passo que os animais submetidos à dieta hipocalórica apresentaram redução do seu peso, que foi sendo recuperado com a administração de *Lactobacillus* na concentração 10^8 , considerada como sendo a mínima necessária para promover resultados promissores, já que foram testadas as concentrações 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/mL. Como forma de averiguar ainda a viabilidade das células, foi realizado outro experimento com células viáveis e não-viáveis de *Lactobacillus*, e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Estes resultados corroboram com o de Higginbothan e Bath (1993), que relataram aumentos no ganho de peso semelhantes, quando culturas de *Lactobacillus* viáveis e não-viáveis foram administradas em bezerros. Uma das vantagens de se usar probióticos não-viáveis é o fato de poderem ser incorporados em produtos tratados pelo calor.



A

B



C

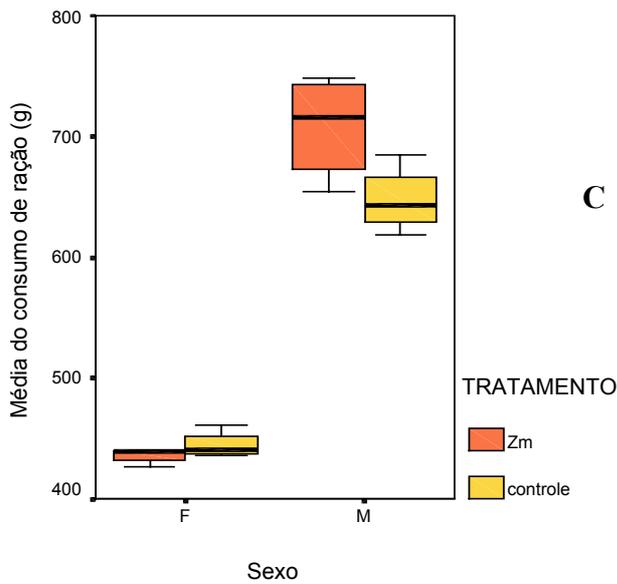


Figura 4– Ingestão alimentar de ratos submetidos a uma dosagem de *Zymomonas mobilis* (Zm) na concentração de 10^9 UFC/mL e daqueles que receberam água (controle). Gráfico A= corresponde à média do consumo semanal de ração em função do tratamento; Gráfico B= corresponde à média do consumo semanal de ração em função do sexo; Gráfico C = corresponde à média do consumo semanal de ração em função da relação tratamento x sexo.

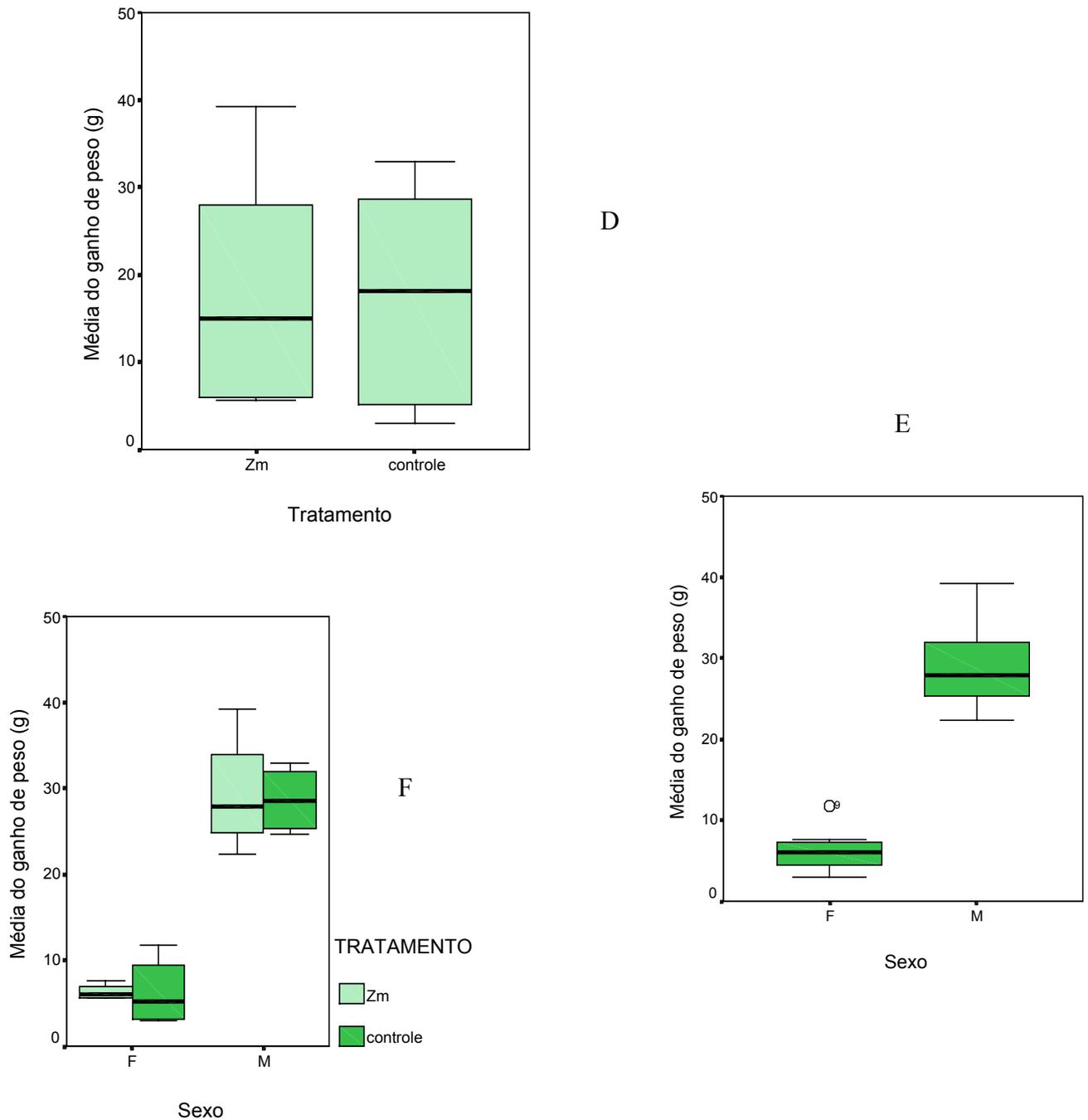


Figura 5 – Média de ganho de peso de ratos submetidos a uma dosagem de *Zymomonas mobilis* (Zm) na concentração de 10^9 UFC/mL e daqueles que receberam água (controle). Gráfico D= corresponde à média do consumo semanal de ração em função do tratamento; Gráfico E = corresponde à média do consumo semanal de ração em função do sexo; Gráfico F = corresponde à média do consumo semanal de ração em função da relação tratamento x sexo.

5.2. Experimento 2

5.2.1. Avaliação Leucocitária Total e Diferencial

Os resultados das contagens totais e diferenciais de leucócitos para animais tratados estão expressos na Tabela 2, obtidos antes (T0) e após 30 dias da inoculação com *Zymomonas mobilis* (T30). Verifica-se que as diferenças entre as médias para os leucócitos totais e diferenciais foram significativas, exceto para os neutrófilos ($p > 0,05$). Fato este também observado para animais controles (tabela 3).

Tabela 2 – Contagem de leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico de animais tratados com *Zymomonas mobilis*.

Leucócitos	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Significância
Leucócitos totais T0 - T30	1630,00	2279,401	720,810	0,050
Neutrófilos T0 - T30	- 254,80	945,281	298,294	0,416
Eosinófilos T0 - T30	- 110,50	132,016	41,747	0,027
Linfócitos T0 - T30	1631,40	1954,387	618,031	0,027
Monócitos T0 - T30	363,90	134,651	42,580	0,000

T= tempo em dias
As médias foram comparadas por teste T pareado.

Tabela 3 – Contagem de leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico de animais controle.

Leucócitos	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Significância
Leucócitos totais T0 - T30	1530,00	1902,659	601,674	0,032
Neutrófilos T0 - T30	-436,70	1463,745	462,877	0,370
Eosinófilos T0 - T30	-107,60	137,726	43,553	0,036
Linfócitos T0 - T30	1729,20	1305,134	412,720	0,002
Monócitos T0 - T30	344,50	151,329	47,854	0,000

T= tempo em dias
As médias foram comparadas por teste T pareado.

A administração de bactérias probióticas representa uma forma de estimular a imunidade inata do hospedeiro por aumentar a resposta imune sistêmica ou por modular as funções das células imunocompetentes (Perdigón et al., 1986). Entretanto, muito pouco se sabe acerca da modulação da imunocompetência epitelial por bactérias não-patogênicas e seu papel na fisiologia de defesa da mucosa (Blum et al., 1999), como também se desconhece a dose/concentração responsável pelos efeitos imunomodulatórios de diferentes cepas de probióticos ou sobre os mecanismos destes efeitos. Conseqüentemente, a imunomodulação por probióticos pode ainda não ser realizada de uma maneira controlada, limitando então sua aplicação clínica (Marteau apud Kirjavainen et al., 1999).

Recentes experimentos com animais ‘germ-free’ têm demonstrado que a flora normal afeta diretamente as funções fisiológicas intestinais (Neish, 2002) e que o hospedeiro tem uma resposta imune para cada espécie bacteriana benigna utilizada para colonizar o animal (Jiang et al., 2004).

Gill et al. (2000) administraram cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) e *Bifidobacterium lactis* (HN019), em camundongos saudáveis, com a finalidade de avaliar o efeito destas cepas sobre vários índices da resposta imune. Os autores verificaram que a suplementação da dieta com estas bactérias por 10 ou 28 dias resultou em um significativo aumento da atividade fagocítica de leucócitos sanguíneos e macrófagos peritoneais, comparados com os animais controle. Para avaliar o efeito destas bactérias sobre a função de células B e T do camundongo, respostas de proliferação de células esplênicas para lipopolissacarídeo foram mensuradas *in vitro*. Aos 10 e 28 dias de inoculação com *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*, foram detectadas respostas proliferativas mais intensas, significativamente, em relação ao controle. Em outro experimento, realizado por Médici, Vinderola e Perdígón (2004), foi comprovado mais uma vez que a flora bacteriana associada com a mucosa pode influenciar o nível de ativação de macrófagos, fato observado ao submeter camundongos saudáveis a uma dieta com queijo probiótico, produto alimentício veiculador de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* (bactérias ‘starter’), *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* (bactérias probióticas).

Resultados discordantes foram encontrados por Zhou et al. (2000), onde mostraram que mesmo as cepas recém-isoladas e já caracterizadas com propriedades imunoestimulantes por Gill et al. (2000), não provocaram diferenças nos parâmetros hematológicos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos) em relação ao controle.

5.2.2. Estudo histopatológico

O estudo histológico do baço, fígado e intestino delgado não evidenciou diferença morfológica entre os grupos experimentais e controle.

No baço, observou-se distribuição uniforme dos folículos linfóides primários e secundários e das bainhas peri-arteriolas da polpa branca. Na polpa vermelha não houve sinais de congestão. No fígado, não houve sinais de necrose ou infiltrado inflamatório, estando os hepatócitos bem preservados. No intestino delgado, observou-se uniformidade na morfologia das vilosidades e na quantidade de muco armazenado pelas células caliciformes. As placas de Peyer apresentaram-se preservadas, com sua estrutura morfológica normal.

O epitélio do trato intestinal é um tecido complexo, dinâmico e muito bem equipado para funcionar na secreção de fluidos e enzimas digestivas, essenciais para o processamento de substâncias alimentares. O epitélio intestinal compreende uma área de superfície de cerca de 200 metros quadrados (m²) com apenas uma única camada espessa de células, organizadas em vilosidades (Madara, 1990).

Particularmente no cólon, a mucosa está, por um lado, em contato com um ecossistema diverso de organismos procariotos existentes em densidades de 10¹¹ organismos/ mL de conteúdo luminal e, por outro, encontra-se um sistema biológico extremamente sensível a esses organismos e seus metabólitos (Neish, 2002).

A importância desses compartimentos epiteliais como componentes essenciais na defesa das mucosas e homeostase dos tecidos foi reconhecida (Eckmann et al., 1993).

Isto envolve os dois maiores componentes celulares: os linfócitos intraepiteliais e as células epiteliais intestinais (Blum et al., 1999).

Células epiteliais intestinais são consideradas constituintes essenciais do sistema imune da mucosa. Elas são as primeiras células do hospedeiro que entram em contato com antígenos luminiais e microrganismos, comensais ou patógenos, e podem dispor de funções apresentadoras de antígenos (Huges et al, 1991). Sob estimulação, as células epiteliais mudam o seu fenótipo-imune e produzem uma vasta quantidade de imunomoduladores. Tais mudanças fenotípicas tornam as células epiteliais mais ativas no recrutamento de células inflamatórias e imunes para controlar patógenos invasores (Eckmann et al., 1993).

O processo de inflamação começa quando sinais endógenos ou exógenos de perigo induzem liberação local de mediadores inflamatórios que servem para aumentar a permeabilidade vascular e atrair células inflamatórias, inicialmente neutrófilos e posteriormente monócitos e linfócitos. Tipicamente, o exame histopatológico de um tecido inflamado exhibe edema e elevados números de leucócitos no tecido afetado (Neish, 2002).

Neste estudo em questão, pode-se dizer que as análises microscópicas não revelaram sinais de inflamação, degeneração ou necrose da mucosa intestinal, nem tampouco alteração na organização das células epiteliais entre os grupos tratado com *Z. mobilis* e controle. A inoculação oral com *Zymomonas* não causou efeitos adversos sobre a integridade da mucosa intestinal, o que permite sugerir que esta cepa é considerada não-tóxica e não-patogênica. Resultados semelhantes foram encontrados por Shu et al. (1999) e Zhou et al. (2000).

5.2.3. Translocação bacteriana

Não houve crescimento de células de *Zymomonas mobilis* (meio SLP), *Escherichia coli* (meio EMB) e *Enterococcus* (meio ME), correspondentes às amostras de sangue coletado de todos os animais, tratado e controle.

Translocação bacteriana é um dos indicadores recomendados para assegurar a inocuidade de um probiótico. Refere-se ao fenômeno em que bactérias passam através da mucosa epitelial intestinal, em direção à lâmina própria, nodos linfáticos mesentéricos e seguem em direção aos órgãos (Zhou et al., 2000). Subseqüentemente, podem disseminar no corpo causando sepse, choque, falhas múltiplas de órgãos ou até mesmo a morte do hospedeiro (Guarner, Malagelada, 2003).

Até o momento, não se têm informações acerca da capacidade de translocação de *Zymomonas mobilis* em homens e animais. Embora o trato gastrointestinal contenha muitos organismos procarióticos, que baseado no número de células compreendem mais do que todas as células do corpo, o sangue é completamente isento de bactérias. Este ambiente é conseguido e mantido pela estrutura física do trato gastrointestinal, bem como pela atividade do sistema imune na prevenção do crescimento excessivo e da translocação bacteriana (Prindull, Ahmad, 1993).

Três mecanismos primários parecem promover a translocação bacteriana: supercrescimento de bactérias intestinais, causada por um desequilíbrio ecológico; aumento da permeabilidade da mucosa como resultado de uma barreira defeituosa; e deficiências nas defesas imunes do hospedeiro (Berg, 1999).

É variável a taxa eficiência com que bactérias endógenas translocam do trato gastrintestinal. Gram-negativas, anaeróbios facultativos tais como Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* translocam em maior grau do que outras bactérias endógenas, ao passo que anaeróbias estritas e gram-positivas parecem ser translocadores menos eficientes (O'Boyle et al., 1988).

Acredita-se que uma pequena taxa de translocação espontânea de bactérias endógenas do lúmen para nodos linfáticos ocorre continuamente em hospedeiros saudáveis. Essa migração de bactérias é geralmente bloqueada durante a rota, podendo o processo ainda ser benéfico ao hospedeiro por estimular a imunidade, embora mais estudos devam ser realizados para fundamentar esta hipótese (Shanahan, 2002).

Zhou et al. (2000) detectaram poucas células bacterianas em tecidos extraintestinais, predominantemente nos nodos linfáticos mesentéricos, tanto no grupo tratado como no controle, indicando que a translocação não foi associada ao probiótico. O que dá mais fundamento a esta hipótese é o fato de as análises moleculares terem mostrado que as cepas de bactérias ácido-láticas encontradas eram diferentes das que foram inoculadas no animal. Os autores concluíram que as cepas ácido-láticas HN019, HN001 e HN017 não possuem a capacidade de se translocar do intestino para outros tecidos, ou então elas translocam para o tecido linfóide associado ao intestino e outros tecidos, e depois são mortas pelas defesas imunes do hospedeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por Steffen, Berg (1983) e Shu et al. (1999), embora Huang, Kotula, Adams (2003) e Médici, Vinderola e Perdigon (2004) não tenham detectado translocação bacteriana em seus estudos. Médici et al. (2004) sugerem que o alto número de bactérias presentes no queijo probiótico não afetou a integridade do epitélio intestinal nem o balanço da microbiota residente.

Neste estudo, não foi detectada translocação para o sangue das bactérias *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus*, por um período de 30 dias de administração com Zm, sugerindo que a quantidade de bactérias ingeridas não causou infecção sistêmica e não foi prejudicial ao animal, confirmado também pelas mensurações hematológicas e histológicas, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos tratado e controle foi encontrada.

5.2.4. Avaliação da microbiota intestinal, quanto à contagem de *Escherichia coli* e *Enterococcus*

Conforme os resultados obtidos das contagens de *Escherichia coli* (Figura 6) e *Enterococcus* (Figura 7), realizadas antes (T0) e após 30 dias da inoculação com *Zymomonas mobilis* (T30), pode-se dizer que houve significância nas diferenças das médias da contagem bacteriana, por um período de 30 dias, para *E. coli* e para *Enterococcus*, nos animais tratados. Quanto aos animais controle, foi comprovado que as diferenças entre as médias do T30 em relação ao T0 foram significativas ($p < 0,05$) apenas para a contagem de *Enterococcus*.

Comparando-se os dois grupos de animais (tratado e controle), percebe-se que os mesmos diferiram apenas em relação à bactéria *Escherichia coli*, ou seja, apenas nos animais tratados foi detectado um aumento significativo desta bactéria em um período de 30 dias.

Escherichia coli e *Enterococcus* exercem importantes papéis na fisiologia intestinal. São organismos facultativos, presentes predominantemente na flora de neonatos (Rotimi, Duerden, 1981). Bactérias facultativas (isto é, espécies que crescem

sob condições tanto anaeróbias quanto aeróbias) ajudam a manter um ambiente reduzido no cólon pela utilização de oxigênio que se encontra difuso no lúmen. Na ausência de tais organismos, muitas bactérias anaeróbias extremamente sensíveis ao oxigênio não sobreviveriam, como as bifidobactérias (Simon, Gorbach, 1984).

Além disso, tem sido relatado que algumas cepas de *Escherichia coli* (EM0, JM105) são capazes de proteger animais contra a infecção por *Salmonella typhimurium* (Barrow, Tucker, Simpson, 1987; Hudalt, Gutnot, Servin, 2001) e humanos contra a infecção por outras bactérias enteroinvasivas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* e *Legionella pneumophila* (Altenhoenfer et al., 2004).

Pesquisas realizadas com probióticos apresentam resultados discordantes. Bielecka, Biedrzycka, Majkowska (2002) realizaram um experimento com animais convencionais, a fim de selecionar os probióticos, prebióticos e simbióticos e confirmar os seus efeitos *in vivo*. Das cepas de probióticos utilizadas, encontravam-se *Bifidobacterium longum*, isolada de crianças, e *Bifidobacterium animalis* KSp4, isolada de ratos. Restringindo-se aos probióticos, foi avaliado o seu efeito sobre a microbiota intestinal, no que tange à contagem de bifidobactérias, aeróbios e anaeróbios facultativos, coliformes e esporos de bactérias aeróbias e anaeróbias. Verificou-se que a população de bifidobactérias não teve alteração significativa quando da ingestão de *Bifidobacterium animalis*, ao contrário para *Bifidobacterium longum*, que acentuou significativamente a quantidade dessas bactérias ($p < 0,05$). A contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas não se mostrou diferente entre os grupos. Os autores concluíram que os probióticos não ocasionaram mudanças desfavoráveis na microflora por 14 dias de administração com 10^9 células viáveis, para os grupos de bactérias estudados.

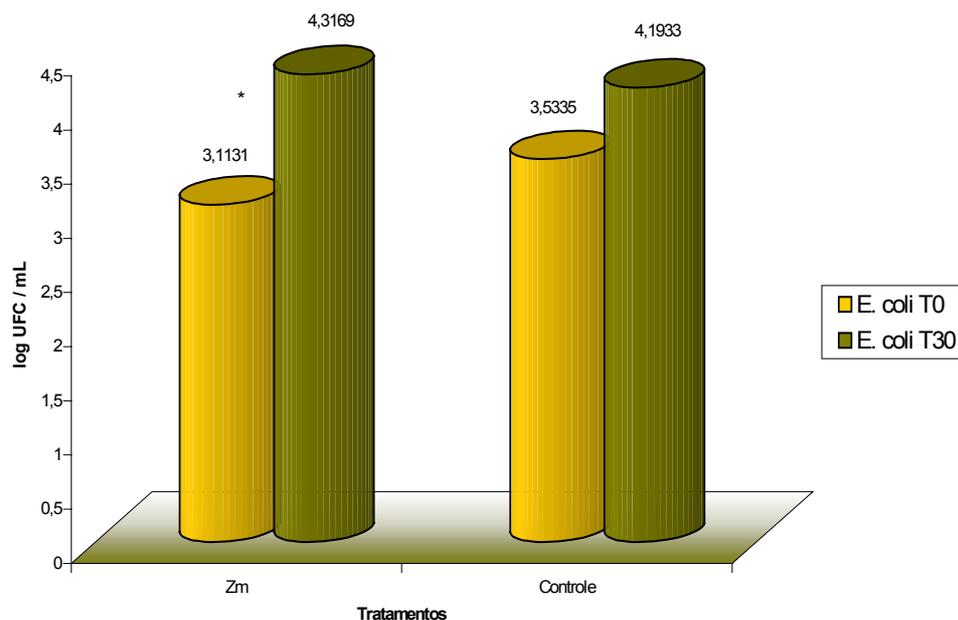


Figura 6– Enumeração de *Escherichia coli* nas fezes de ratos submetidos à dosagem de *Zymomonas mobilis* (Zm) na concentração de 10^9 UFC/mL e daqueles que receberam água (controle), antes (T0) e após a administração com *Zymomonas* (T30). Os valores incluídos nas figuras são valores de log, correspondentes à média da contagem de células.

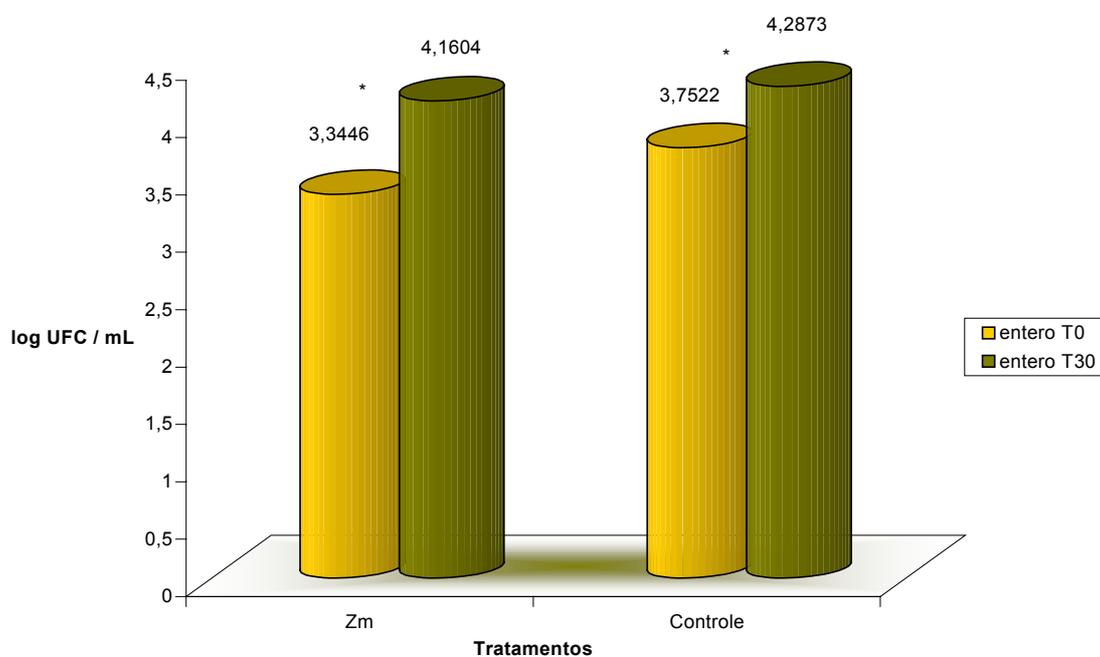


Figura 7– Enumeração de *Enterococcus* nas fezes de ratos submetidos à dosagem de *Zymomonas mobilis* (Zm) na concentração de 10^9 UFC/mL e daqueles que receberam água (controle), antes (T0) e após a administração com *Zymomonas* (T30). Os valores incluídos nas figuras são valores de log, correspondentes à média da contagem de células.

Estudar o impacto de novas preparações de probióticos, contendo cepas de bifidobactérias, lactobacilos e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, sobre a composição da flora fecal de pacientes com colite ulcerativa, foi o objetivo de Venturi et al. (1999). A concentração fecal das bactérias administradas, após 20 dias de tratamento com 10^{11} células/g, foi acentuada ($p < 0,05$), se comparada com o nível basal, e nenhuma mudança significativa para os números de *Bacteroides*, clostridio, coliformes e bactérias totais aeróbias e anaeróbias foi registrada. Diante disso, os autores sugerem a administração de várias cepas de probióticos como alternativa mais viável. Berg (1998) já havia feito alusão ao fato de que espécies singulares de microrganismos seriam incapazes de colonizar o trato gastrointestinal, e mais ainda, de modificar a microecologia intestinal.

A este respeito, não foi o que observaram O'Marrony et al. (2001), que determinaram, dentre outros, os efeitos da ingestão de *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius* UCC118 sobre a microbiota gastrointestinal de camundongos, durante um período de 16 semanas. Os resultados evidenciaram uma redução significativa nos níveis de coliformes fecais e *Enterococcus* nos animais que receberam 10^9 células/mL do probiótico.

A microflora normal dispõe de uma notável estabilidade quantitativa e qualitativa, refletida por uma excelente sintonia que os microrganismos apresentam ao limitar a invasão de estranhos ou o supercrescimento (superinfecção) de um membro minoritário da população. Isto acontece nos casos de reduções significativas de alguns componentes individuais da flora. Portanto, a alta estabilidade intrínseca da microbiota endógena pode representar o maior obstáculo para modificação de sua composição pela introdução de cepas específicas (Tagg, Dierksen, 2003).

No que se refere a *Zymomonas mobilis*, pode-se dizer que, neste estudo, não se conseguiu isolá-la das fezes dos animais. Sabe-se, contudo, que após a ingestão pelo rato, *Zymomonas mobilis* foi confrontada diante de muitos efeitos físico-químicos que podem adversamente ter influenciado a sua viabilidade. Esses incluem o ácido gástrico, sais biliares e enzimas pancreáticas. Considerando a sua sobrevivência durante esta passagem, ao chegar no intestino grosso, ainda teve que competir efetivamente com uma flora endógena complexa e metabolicamente ativa, formada por centenas de outras espécies bacterianas.

Outro agravante é o fato de ter sido utilizado meio seletivo para seu isolamento, que pode ter subestimado sua presença. Isto porque a utilização deste tipo de meio pode ter permitido o crescimento de outras espécies bacterianas, inclusive as não identificadas, dada a sua diversidade na microbiota, levando à exclusão competitiva, principalmente se as células de *Zymomonas mobilis* estiveram presentes em baixos níveis, em virtude das condições adversas a que foi submetida.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Mediante os resultados, pode-se inferir as seguintes conclusões:

- A ingestão de *Zymomonas mobilis*, após um período de 30 dias, não influenciou no consumo de ração nem no ganho de peso dos animais; não causou alteração morfológica qualitativa entre os grupos experimental e controle, evidenciado pelo estudo histológico do fígado, baço e intestino, não alterou a contagem total e diferencial de leucócitos e não promoveu translocação bacteriana para o sangue.
- Houve diferença quanto à microbiota intestinal, apenas em relação à bactéria *Escherichia coli*.
- *Zymomonas mobilis* comportou-se como uma bactéria não-patogênica e não tóxica, podendo, pois, ser segura ao consumo humano.

Referências Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTT, A. Gut reaction. Consumers are stocking up on live yoghurts and fermented drinks that claim to improve health. But is there any science behind the marketing of these 'probiotics products? **Nature**, v. 427, p.284-286, 2004.

AL-ANKARI, A. S.; HOMEIDA, A. M. Effect of antibacterial growth promoters on the immune system of broiler chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, p. 277-283, 1996.

ALTENHOEFER, A. et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 1660, p. 1-7, 2004.

AIZAPURUA, D. H; RUSSEL-JONES, H. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 440-451, 1988.

AURELI, P.; FRANCIOSA, G. Interactions between novel microorganisms and intestinal flora. **Digestive and liver disease**, v. 34, p.29S-33S, 2003.

BARROW, P.; TUCKEY, J.; SIMPSON, J. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* Gram negative facultatively anaerobic bacteria. **Epidemiology and Infection**, v. 98, p. 311-322, 1987.

BEKERS, M. et al. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v.38, p. 701-106, 2002.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v. 35, p. 125-131, 2002.

BERG, R. D. Probiotics, prebiotics or ‘conbiotics’? **Trends in Microbiology**, v.6, n. 3, p. 89-92, 1998.

BERG, R. D. Bacterial translocation from gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 473, p. 11-30, 1999.

BERNADEAU, M.; VERNOUX, J. P; GUEGUEN, M. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 19-27, 2002.

BLUM, S. et al. Interactions between comensal bacteria and mucosal immunocompetent cells. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 63-68, 1999.

CALAZANS, G. M. T. Produção de levana para uso clínico, RJ, Brasil. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

CALAZANS, G. M. T. et al. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245-247, 2000.

CALICH, V.; VAZ, C. A. C. **Imunologia**. Editora Revinter Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

CANALLI, L. S. et al. Alteração da microbiota intestinal de frangos de corte pela utilização de probiótico na alimentação. **Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 125-132, 1996.

CLARE, S; HUETT, A.; DOUGAN, G. Host-pathogen interactions at mucosal surfaces: immune consequences. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 455-459, 2002.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics , prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1052S-1057S, 1999.

COLLINS, J. K.; THORTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotics strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

CORRÊA, G. S. S. et al. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento da carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467-473, 2003.

CUMMINGS, J. H. et al. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. **European Journal o Clinical Nutrition**, v. 51, p. 417-423, 1987.

CZERKINSKY, C. et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunology Reviews**, v. 170, p. 197-222, 1999.

DAFWANG, I. I.; BRID, H. R.; SUNDE, M. L. Broiler chick growth response to antibiotics. **Poultry Science**, v. 63, p. 1027-1032, 1984.

DOELLE, H. W. et al. *Zymomonas mobilis* –science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v13, p. 57-98, 1993.

DUGAS, B. et al. Immunity and probiotics. **Trends Immunology Today**, v. 20, n. 9, p. 387-390, 1999.

ECKMANN, L. et al. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1689-1697, 1993.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 5, n. 2, 2003.

FALCAO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 21, n. ½, 1982.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARSIDE, P.; MEL, M. A.; KHORUTS, A. Oral tolerance and disease. **Gut**, v. 44, p. 137-142, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GILL, H. S. et al. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) e *Bifidobacterium lactis* (HN019). **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 167-176, 2000.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 755-773, 2003.

GISMONDO, M.R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antiimicrobial agents**, v. 12, p. 287-292, 1999.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 80, (Suppl. 2), S.203-207, 1998.

GOMES, A. P. Observações sobre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluver, Van Niel, 1936 (*Thermobacterium mobili*, Lindner, 1928; *Pseudomonas lindneri* Kluver & Hoppenbrowers, 1931) na terapêutica humana. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.2, n. ½, p. 77-81, 1959.

GONÇALVES DE LIMA, O.; SCHUMACKER, I. E.; ARAÚJO, J. M. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 12, n. ½, 1972.

GONÇALVES DE LIMA, O. et al. Estudos de microorganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas do Recife. I –sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kuyver e Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var *recifensis* (Gonçalves de Lima, Araújo, Schumacher & (Cavalcanti) (1970) isolada da bebida popular denominada ‘caldo de cana picado’. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.10,p. 3-15, 1970.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 60, p. 512-519, 2003.

HARGROVE, R. E.; ALFORD, J. A. Growth rate and feed efficiency of rats fed yogurt and other fermented milks. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 11-19, 1978.

HART, A. L.; STAGG, A. J.; KAMM, M. A. Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 36, n. 2, p. 111-119, 2003.

HIGGINBOTHAM, G. E.; BATH, D.L. Evaluation of *Lactobacillus* fermentation cultures in calf feeding systems. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 615-620, 1993.

HUANG, Y.; KOTULA, L.; ADAMS, M. C. The *in vivo* assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1781-1787, 2003.

HUDALT, S.; GUTNOT, J; SERVIN, A. L. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germ free mice against *Salmonella typhimurium*. **Gut**, v. 49, p. 47-55, 2001.

HUGES, A. et al. Expression of MHC class II (Ia) antigen by the neonatal enterocyte: the effect of treatment with IFN. **Immunology**, v. 72, p. 491-496, 1991.

JIANG, H.-Q. et al. Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host. **Vaccine**, v. 22, p. 805-811, 2004.

JIN, L.Z. et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v. 53, p. 351-368, 1997.

JONG, E. V. e al. Uso de avoparcina e virgianiamicina como promotores de crescimento em rações para frangos de corte. 1- efeito sobre desempenho produtivo e utilização da energia da ração. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 14, n. 5, p. 529-535, 1985.

KAGNOFF, M. F; ECKMANN, L. Perspective Series: Host/pathogen interactions. Epithelial cells as sensors for microbial infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 1, p. 6-10, 1997.

KIRJAVAINEN, P. V. et al. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, p. 131-135, 1999.

KLAPPROTH, J. M. et al. Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 2248-2254, 1995.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 229-238, 2001.

LIMA, G. M. S. Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação do mestrado**, do programa de Pós-graduação em Biotecnologia de produtos bioativos. CCB, UFPE, 72p, 2002.

LODDI, M. M. et al. Efeito da adição de probiótico e antibiótico como promotores do crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. IN: Nutrição de Ruminantes. **Anais da XXXV reunião da SBZ – Botucatu**, p. 189-191, 1998.

LOPES, C. A. C. et al. Efeitos obtidos com o emprego da cultura de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* em portadores de enterocolites bacterianas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 20, n. ½, 1980.

LU, L.; WAKER, A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, S. 1124-1130, 2001.

MATTILA-SANDHOLM, T., MÄTTO, J., SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 25-35, 1999. MADARA, J. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. **American Journal of Pathology**, v. 137, p. 1273-1281, 1990.

MARTEAU, P. R. et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.4305-4365, 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR, C. A. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptative immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-397, 1997.

MÉDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. x, p. xx-xx, 2004.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: Comissão de Ensino do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos de em Bioterismo**. 2^a ed.. São Paulo: EMP, p. 15-25, 1996.

MICHELAN, A. C. et al. Utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento: ensaio de digestibilidade, avaliação da morfometria intestinal e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2227-2237, 2002.

MITSUOCA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v. 50, p.438-446, 1992.

McNAUGHT, C. E.; MacFIE, J.; Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. **Nutrition Research**, v. 21, p. 343-353, 2001.

MULDER, R. W. A. W. Probiotics as a tool against *Salmonella* contamination. **Misset World Poultry**, v. 7, n. 3, p. 36-37, 1991.

NEISH, A. S. The gut microflora and intestinal epithelial cells a continuing dialogue. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 309-317, 2002.

NEUTRA, M.R; FREY, A.; KRAEHENBUHL, J.P.Gateways for mucosal infection and immunization. **Cell**, v. 86, p. 345-348, 1996.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Moduladores do Ecosistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, p. 34-38, 2000.

NOBLE, W. C.; VIRANI, W. C.; CREE, R. G. A. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, p. 195-198, 1992.

O'BOYLE, C. J. Microbiology of bacterial translocation in humans. **Gut**, v. 42, p. 29-35, 1988.

O'BRIEN, J. et al. Safety evaluation of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 418-424, 1999.

O'MARRONY, L. et al. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 1219-1225, 2001.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 43-52, 1999.

PASCUAL, M. et al. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4981-4986, 1999.

PERDIGÓN, G. et al. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infection and Immunity**, v. 53, p. 404-410, 1986.

PERDIGON, G. et al. Effect of viable *Lactobacillus casei* feeding on the immunity of the mucosal and intestinal microflora malnourished mice. **Milchwissenschaft**, v. 50, n.5, p. 251-256, 1995.

POLLMANN, D. S.; DANIELSON, D. M.; PEO, E. R. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 577-581, 1980.

PRINDULL, G.; AHMAD, M. The ontogeny of the gut mucosal immune system and the susceptibility to infections in infants of developing countries. **European Journal of Pediatric**, v. 152, p. 786-792, 1993.

ROTIMI, V. O.; DUERDEN, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 14, p. 51-62, 1981.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 80, (Suppl) 1, p. 147S-171S, 1998.

SALYERS, A. A.; SHOEMAKER, N. B. Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. **Clinical Infectious Disease**, v. 23, p. 53S-54S, 1996.

SANTOS, J. F. M. Avaliação do efeito imunoestimulante da cultura de *Zymomonas mobilis* através da dosagem de citocinas humanas e de sua ação frente a infecção esquistossomótica experimental. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil. 2002.

SARTOR, R. B.; RATH, H. C.; SELLON, R. K. Microbial factors in chronic intestinal inflammation. **Current opinion in Gastroenterology**, v. 12, p. 327-333, 1996.

SAXELIN, M. et al. Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. **Infectious Disease in Clinical Practice**, v. 5, p. 331-335, 1996.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, v. 86, p. 174-193, 1984.

SHANAHAN, F. The host microbe interface within the gut. **Best Practice & Research Gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 915-931, 2002.

SHU, Q. et al. Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 831-836, 1999.

SHU, Q.; GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157:H7 in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 54-64, 2002.

SMITH, E. A.; MacFARLANE, G. T. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 288-302, 1996.

SNOEP, J. L. et al. Control of glycolytic flux in *Zymomonas mobilis* by glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 190-197, 1996.

SOUZA, C.; SOUZA, L. A. G. Colpites and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 13, p. 85-87, 1973.

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

STEFFEN, E. K.; BERG, R. D. Relationship between caecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p. 1215-1259, 1983.

SWINGS, Y.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Bacteriology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.

TAGG, J. R.; DIERKSEN, K. P. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 6, 2003.

TANNOCK, G. W. Molecular assessment of intestinal microflora. **American Journal Clinical Nutrition**, v., p. 410-444, 2001.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Minas Gerais, 2003. cap. 2.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III alternatives to antibiotic growth promotants. **Annals of Zootechnology**, v. 47, p. 245-271, 1998.

VAN DER WAAIJ, D.; NORD, C. E. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria: an analysis and a new approach to this urgent problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 191-197, 2000.

VAUGHAN, E. E., MOLLET, B. DeVOS, W. M. Functionality of probióticos and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 505-510, 1999.

VENTURI, A. et al. Impact on the composition oh the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminarly data on maintenance treatment of patients with ulcerative colits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 1103-1108, 1999.

VIKARI, L.; GISLER, R. By-subproducts in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.23, p. 240-244, 1986.

WANICK, M. C.; SILVA, E. C. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Cândida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, p. 69-71, 1971.

WANICK, M. C. et al. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928) Kuyver & Van Niel. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, n. ½, 1970.

WAARD, R. et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 93-100, 2002.

WHITE, D. G. et al. The road to resistance: antibiotics as growth promoters for animals. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 147-1154, 2001.

ZHOU, J. S. et al. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* HN017 and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Food Microbiology**, v. 56, p. 87-96, 2000.

ZUANÓN, J. A. S. et al. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n. 5, p. 999-1005, 1998.

Anexos

Anexo 1 : Distribuição de frequências e análise de covariância para média do ganho de peso e consumo de ração.

Distribuição de freqüências

Média do consumo de ração e média de ganho de peso/ semana dos animais do sexo feminino tratados com *Zymomonas mobilis*,

Statistics^a

		consumo de ração	média do ganho de peso
N	Valid	4	4
	Missing	0	0
Mean		435,75	6,300
Std. Error of Mean		3,276	,4509
Std. Deviation		6,551	,9018
Variance		42,917	,8133

a. TRATAMENTO = Zm, SEXO = F

Média do consumo de ração e média de ganho de peso/ semana dos animais do sexo masculino tratados com *Zymomonas mobilis*,

Statistics^a

		consumo de ração	média do ganho de peso
N	Valid	4	4
	Missing	0	0
Mean		708,50	29,350
Std. Error of Mean		21,796	3,5415
Std. Deviation		43,593	7,0831
Variance		1900,333	50,1700

a. TRATAMENTO = Zm, SEXO = M

Média do consumo de ração e média de ganho de peso/ semana dos animais controle do sexo feminino.

Statistics^a

		consumo de ração	média do ganho de peso
N	Valid	4	4
	Missing	0	0
Mean		444,50	6,300
Std. Error of Mean		5,694	2,0421
Std. Deviation		11,387	4,0841
Variance		129,667	16,6800

a. TRATAMENTO = controle, SEXO = F

Média do consumo de ração e média de ganho de peso/ semana dos animais controle do sexo masculino.

Statistics^a

		consumo de ração	média do ganho de peso
N	Valid	4	4
	Missing	0	0
Mean		647,75	28,700
Std. Error of Mean		13,817	1,9757
Std. Deviation		27,633	3,9514
Variance		763,583	15,6133

a. TRATAMENTO = controle, SEXO = M

Análise de covariância, sendo a média de ganho de peso a variável dependente e o

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: média do ganho de peso

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2199,647 ^a	5	439,929	37,688	,000
Intercept	2,384	1	2,384	,204	,661
SEXO	14,832	1	14,832	1,271	,286
ÁGUA	41,909	1	41,909	3,590	,087
TRATAMEN	,435	1	,435	,037	,851
RAÇÃO	33,055	1	33,055	2,832	,123
SEXO * TRATAMEN	9,906	1	9,906	,849	,379
Error	116,731	10	11,673		
Total	7307,800	16			
Corrected Total	2316,378	15			

a. R Squared = ,950 (Adjusted R Squared = ,924)

consumo de ração, o tratamento e o sexo como covariáveis.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: média do ganho de peso

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2189,741 ^a	4	547,435	47,552	,000
Intercept	16,163	1	16,163	1,404	,261
SEXO	53,170	1	53,170	4,618	,055
ÁGUA	59,326	1	59,326	5,153	,044
TRATAMEN	,352	1	,352	,031	,864
RAÇÃO	23,676	1	23,676	2,057	,179
Error	126,636	11	11,512		
Total	7307,800	16			
Corrected Total	2316,378	15			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,925)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: média do ganho de peso

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2189,389 ^a	3	729,796	68,963	,000
Intercept	19,317	1	19,317	1,825	,202
SEXO	68,422	1	68,422	6,466	,026
ÁGUA	66,258	1	66,258	6,261	,028
RAÇÃO	35,044	1	35,044	3,312	,094
Error	126,989	12	10,582		
Total	7307,800	16			
Corrected Total	2316,378	15			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,931)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: média do ganho de peso

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2189,389 ^a	3	729,796	68,963	,000
Intercept	19,317	1	19,317	1,825	,202
SEXO	68,422	1	68,422	6,466	,026
ÁGUA	66,258	1	66,258	6,261	,028
RAÇÃO	35,044	1	35,044	3,312	,094
Error	126,989	12	10,582		
Total	7307,800	16			
Corrected Total	2316,378	15			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,931)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: média do ganho de peso

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	7145,767 ^a	3	2381,922	191,103	,000
SEXO	1628,737	2	814,369	65,337	,000
ÁGUA	88,642	1	88,642	7,112	,019
Error	162,033	13	12,464		
Total	7307,800	16			

a. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,973)

Contrast Results (K Matrix)

		Dependent Variable	
		média do ganho de peso	
SEXO Simple Contrast ^a			
Level 2 vs. Level 1	Contrast Estimate	32,185	
	Hypothesized Value	0	
	Difference (Estimate - Hypothesized)	32,185	
	Std. Error	3,962	
	Sig.	,000	
	95% Confidence Interval for Difference	Lower Bound	23,625
		Upper Bound	40,745

a. Reference category = 1

Anexo 2: Teste T pareado para a contagem de leucócitos totais e diferenciais, realizada antes e após a inoculação com *Zymomonas mobilis*.

Teste T pareado para leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico de ratos tratados com *Zymomonas mobilis*.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	leucócitos T0 - leucócitos T30	-1630,00	2279,401	720,810	-3260,58	,58	-2,261	9	,050
Pair 2	neutrófilos T0 - neutrófilos T30	254,80	945,281	298,924	-421,41	931,01	,852	9	,416
Pair 3	eosinófilos T0 - eosinófilos T30	110,50	132,016	41,747	16,06	204,94	2,647	9	,027
Pair 4	linfócitos T0 - linfócitos T30	-1631,40	1954,387	618,031	-3029,48	-233,32	-2,640	9	,027
Pair 5	monócitos T0 - monócitos T30	-363,90	134,651	42,580	-460,22	-267,58	-8,546	9	,000

Teste T pareado para leucócitos totais e diferenciais presentes no sangue periférico de ratos controle.

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	leucócitos T0 - leucócitos T30	-1530,00	1902,659	601,674	-2891,08	-168,92	-2,543	9	,032
Pair 2	neutrófilos T0 - neutrófilos T30	436,70	1463,745	462,877	-610,40	1483,80	,943	9	,370
Pair 3	eosinófilos T0 - eosinófilos T30	107,60	137,726	43,553	9,08	206,12	2,471	9	,036
Pair 4	linfócitos T0 - linfócitos T30	-1729,20	1305,134	412,720	-2662,84	-795,56	-4,190	9	,002
Pair 5	monócitos T0 - monócitos T30	-344,50	151,329	47,854	-452,75	-236,25	-7,199	9	,000

Anexo 3: Teste T pareado para a contagem de bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus*, realizada antes e após a inoculação com *Zymomonas mobilis*.

Teste T pareado para as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus* presentes nas fezes de ratos tratados com *Zymomonas mobilis*.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	LECT0	3,1131	8	,87739	,31020
	LECT30	4,3169	8	,68951	,24378
Pair 2	LENTT0	3,3446	8	,61681	,21808
	LENTT30	4,1604	8	,74189	,26230

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	LECT0 - LECT30	-1,2038	1,09865	,38843	-2,1223	-,2853	-3,099	7	,017
Pair 2	LENTT0 - LENTT30	-,8158	,78939	,27909	-1,4758	-,1559	-2,923	7	,022

Teste T pareado para as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus* presentes nas fezes de ratos controle.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	LECT0	3,5335	9	,56501	,18834
	LECT30	4,1933	9	,68211	,22737
Pair 2	LENTT0	3,7522	9	,36108	,12036
	LENTT30	4,2873	9	,50082	,16694

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	LECT0 - LECT30	-,6598	1,04348	,34783	-1,4619	,1423	-1,897	8	,094
Pair 2	LENTT0 - LENTT30	-,5351	,53499	,17833	-,9464	-,1239	-3,001	8	,017