

Influência do Consumo de Iogurte Probiótico na Microbiota Intestinal

Influence of the Consumption of Probiotic Yoghurt on Intestinal Microbiota

Adriana Campana Martini^a; Camila Kalil Olivieri^b; Renata Sfeir de Aguiar^c; Davi Casale Aragon^d; Marilsa Suemy Sakamoto Santini^e; Elsa Helena Walter de Santana^f; Lina Casale Aragon Alegro^{g*}

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a microbiota fecal de indivíduos antes e após o consumo de iogurte probiótico. Para isso, 21 indivíduos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos. Os voluntários seguiram a dieta habitual durante 15 dias, seguida por um período de 30 dias de ingestão dos iogurtes. Um grupo consumiu diariamente, durante 4 semanas, 100 mL de iogurte probiótico e o outro, 100 mL de iogurte sem adição da cultura probiótica. Ao final de cada um dos dois períodos de experimentação os indivíduos coletaram suas fezes em recipientes esterilizados para análises. Foram avaliados os seguintes microrganismos: aeróbios e anaeróbios totais, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., enterobactérias e *Bacteroides* sp. Os resultados obtidos para os dois grupos, nos diferentes períodos foram comparados utilizando-se teste não paramétrico de Wilcoxon. O consumo do iogurte probiótico foi eficiente na modulação da microbiota intestinal dos voluntários. As populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* aumentaram nas fezes dos indivíduos após a ingestão do iogurte contendo probióticos. Em relação às bactérias potencialmente patogênicas, a população de *Bacteroides* aumentou para o grupo probiótico, durante o tempo.

Palavras-chave: Iogurte. Probiótico. Microbiota fecal.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the fecal microbiota of individuals before and after consumption of probiotic yoghurt. For this, 21 individual were randomly divided in 2 groups. Volunteers followed their usual diet for 15 days followed by a period of 30 days of yoghurts ingestion. One group consumed diary, during 4 weeks, 100 mL of probiotics yoghurt and another, 100 mL of yogurt without the addition of the probiotic culture. At the end of each two periods of trial, volunteers collected their feces in sterile recipient for analysis. They were evaluated for the following microorganisms: total aerobic and anaerobic bacteria, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., Enterobacteria and *Bacteroides* sp. The results obtained for two groups in different periods were compared using nonparametric Wilcoxon test. Consumption of probiotic yogurt was efficient in the modulation of intestinal microbiota of the volunteers. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* populations had increased in feces after ingestion of probiotic yoghurt. About the potentially pathogenic bacteria, *Bacteroides* populations had increased, for probiotic group, during the time.

Key words: Yogurt. Probiotic. Fecal microbiota.

^a Graduada em Farmácia – Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: dri_martini@hotmail.com.

^b Graduada em Farmácia Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: milakaoli@hotmail.com.

^c Graduada em Farmácia - Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: renatasfeir@hotmail.com.

^d Mestre em Saúde na Comunidade – Universidade de São Paulo (USP). E-mail: dcaragon@terra.com.br

^e Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: marilsa.santini@unopar.br

^f Doutora em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: elsahws@hotmail.com.

^g Doutora em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). Docente da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). E-mail: lcalegro@yahoo.com.br.

* Endereço para correspondência: Rua Marselha, 183, 86041-100, Jardim Piza, Londrina, PR.

1 Introdução

O intestino humano é composto por 3 componentes permanentemente em contato e interação: as células do hospedeiro, os nutrientes e a microbiota¹. A microbiota intestinal é composta de vários microrganismos aeróbios, anaeróbios e facultativos, que vivem simbioticamente no trato digestivo do ser humano².

Este ecossistema é composto por duas classes de microrganismos: da microbiota endógena, que vive aderida às membranas mucosas do trato digestivo, e exógena, que

atravessa o trato gastrointestinal. Existe cooperação sinérgica entre os microrganismos residentes e o hospedeiro, formando uma barreira funcional, denominada resistência à colonização, que protege o intestino da colonização por microrganismos exógenos e de seus efeitos patogênicos³.

A microbiota intestinal é benéfica para o indivíduo quando diferentes espécies vivem em simbiose⁴. Algumas bactérias que compõem a microbiota são sempre benéficas, sendo as bifidobactérias e os lactobacilos os principais representantes desse grupo⁵. Outras bactérias possuem fatores de virulência e podem causar dano à célula intestinal e ter comportamento de comensal, tornando-se patogênicas, em condições propícias, como o *Clostridium* sp.¹

A complexa composição da microbiota intestinal é relativamente estável em indivíduos saudáveis, sendo que o seu desequilíbrio pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana⁶. Essa microbiota, quando desbalanceada, pode ser responsável por alterações como diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, alergia alimentar, eczema atópico e doenças inflamatórias intestinais. Sendo assim, a correção das propriedades da microbiota autóctone em desequilíbrio constitui-se a base da terapia por probióticos^{7,8}.

Sanders⁹ definiu probióticos como culturas puras ou mistas de microrganismos vivos que, quando aplicadas aos animais ou

ao homem, têm efeitos benéficos ao hospedeiro, promovendo o balanço da microbiota intestinal. Atualmente, a definição mais aceita é a de que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro¹⁰

Dentre os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas destacam-se: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imunológico¹¹⁻¹⁶.

Três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos foram descritos por Fuller¹⁷, o primeiro a supressão do número de células viáveis por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, pela competição por nutrientes e competição por sítios de adesão; o segundo mecanismo se refere à alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; e o terceiro relaciona-se ao estímulo da imunidade do hospedeiro, pelo aumento nos níveis de anticorpos e atividade de macrófagos.

Um microrganismo probiótico deve, sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal^{6,18} para que os efeitos benéficos sejam observados. Os probióticos só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem população mínima de células viáveis^{19,20}. A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 a 10^9 UFC correspondente ao consumo de 100g de produto que contenha 10^6 a 10^7 UFC/g.²¹

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do consumo de iogurte contendo o microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis* na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis.

2 Material e Método

Dois tipos de iogurtes comerciais foram adquiridos, um contendo microrganismos probióticos e outro, não. Esses iogurtes foram separados em garrafas plásticas com tampa, esterilizadas, com capacidade para 1000 mL, contendo as informações sobre validade e quantidade a ser ingerida. A cada 7 dias, uma garrafa foi entregue a cada indivíduo que participou do teste. Os voluntários receberam, juntamente com o iogurte, um copo medida para que fosse ingerida, diariamente quantidade de 100 mL.

O estudo realizado foi duplo cego, controlado por placebo, com duração de 45 dias. Pessoas que frequentam a Unopar, na faixa de idade entre 18 e 60 anos foram selecionadas como voluntárias. Durante o período de pré-ingestão, os indivíduos consumiram a dieta habitual e no período de ingestão, os indivíduos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, com 10 e 11 pessoas. Além da dieta habitual, um grupo (1) consumiu diariamente 100 mL de iogurte probiótico (contendo *Bifidobacterium animalis*), enquanto o outro (2) consumiu diariamente 100 mL de iogurte sem adição da cultura probiótica, ambos por período de 4 semanas²² (tabela 1).

Tabela 1: Protocolo experimental do trabalho

Grupos	Pré-ingestão (15 dias)	Ingestão (30 dias)
1	Dieta habitual	Dieta habitual + iogurte probiótico
2	Dieta habitual	Dieta habitual + iogurte sem probiótico

Ao final de cada período de experimentação os indivíduos coletaram suas fezes em recipientes esterilizados, que foram estocados em jarras de anaerobiose²³ a -80°C , por, no máximo 15 dias, até o momento das análises²⁴

Diluições seriadas foram preparadas com água peptonada 0,1% e as enumerações foram realizadas utilizando meios de cultura seletivos da marca ACUMEDIA (EUA): *Enterococcus* sp. (ágar KF *Streptococcus* - $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, anaerobiose)²⁵, *Lactobacillus* sp. (ágar MRS - $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, anaerobiose)²⁶, *Bifidobacterium* sp. (ágar *Bifidobacterium* medium 25 - BIM-25, $37^\circ\text{C}/72\text{h}$, anaerobiose)²⁷, Enterobactérias (ágar MacConkey - $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, anaerobiose)²⁸, *Bacteroides* sp. (ágar BBE - $37^\circ\text{C}/72\text{h}$, anaerobiose)²⁹, Aeróbios totais (ágar para contagem padrão - $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, aerobiose)³⁰, Anaeróbios totais (ágar para contagem padrão - $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, anaerobiose)³⁰.

Para se comparar os diferentes tempos utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras dependentes. Para a comparação de diferentes grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes. As variáveis foram expressas na forma de logaritmo³¹.

3 Resultados e Discussão

As médias das populações (log UFC/g) de *Enterococcus* sp., enterobactérias, aeróbios e anaeróbios totais, *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., nos períodos de pré-ingestão e pós-ingestão são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Médias das populações (log UFC/g) de microrganismos nas amostras de fezes, nos períodos de pré-ingestão e pós-ingestão dos iogurtes

Microrganismo	Média (log UFC/g de fezes)			
	Grupo controle (n=11)		Grupo probiótico (n=10)	
	Pré-ingestão	Pós-ingestão	Pré-ingestão	Pós-ingestão
<i>Enterococcus</i> sp.	6,85	6,77	5,97	6,91
aeróbios totais	6,61	6,95	6,27	7,22
enterobactérias	5,64	5,14	4,69	5,39
anaeróbios totais	7,39	7,05	6,21	7,64
<i>Bacteroides</i> sp.	6,53	6,65	5,70	7,03
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,26	7,24	6,91	7,86
<i>Lactobacillus</i> sp.	6,64	5,43	6,30	6,97

A população de *Enterococcus* se manteve constante ($p>0,05$), durante o tempo, para o grupo controle. Para o grupo que recebeu o iogurte contendo probiótico, embora não tenha sido verificada diferença estatística durante o tempo ($p>0,05$), foi observado o aumento de aproximadamente um ciclo logarítmico na população desse microrganismo (tabela 2).

O gênero *Enterococcus* está amplamente presente na natureza e faz parte do grupo das bactérias ácido lácticas. Algumas bactérias do gênero são usadas como probióticos³²,

tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis*. No Brasil, a ANVISA³³ já incluiu o *E. faecium* na lista dos microrganismos probióticos.

Analisando-se os resultados obtidos na contagem total de bactérias aeróbias, foi possível observar que as populações desses microrganismos mantiveram-se constantes para os dois grupos, durante os diferentes períodos de análise, apesar do aumento não significativo ($p > 0,05$) que pode ser observado na população para o grupo probiótico. Sendo que o mesmo comportamento foi verificado para as enterobactérias (tabela 2), grupo de microrganismos que faz parte das bactérias aeróbias totais. Esses resultados são importantes, uma vez que a maioria das infecções endógenas é causada por este grupo³⁴. As enterobactérias apresentam uma gama de fatores de virulência comprovados e potenciais, sendo, a maioria deles, expressos pelas variedades patogênicas de *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*³⁵. Aumento nessas populações poderia levar à ocorrência de infecções intestinais e extra-intestinais.

Os anaeróbios são microrganismos predominantes na microbiota fecal humana, perfazendo contagem acima de 99% do total de microrganismos³⁶. Pode-se observar, na tabela 2, que, no período de pré-ingestão para o grupo controle, a população de anaeróbios totais é constante, comparando-se com a pós-ingestão para este mesmo grupo. No grupo probiótico, a população desses microrganismos apresentou aumento de 1,2 ciclos logarítmicos após a ingestão do iogurte contendo os microrganismos probióticos, sendo que esse aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para esse grupo.

Dentre os gêneros que fazem parte do grupo dos anaeróbios totais encontram-se *Bacteroides* sp e *Bifidobacterium* sp. Sabe-se que espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* podem estar envolvidas em processos inflamatórios de doenças intestinais³⁷. Nos últimos anos a espécie *B. fragilis* tem sido reconhecida como principal patógeno anaeróbio em infecções endógenas humanas³⁵. Neste trabalho, a população de bacteróides manteve-se constante nas fezes dos indivíduos pertencentes ao grupo controle. Ao contrário do que se esperava, para o grupo tratado com iogurte probiótico observou-se aumento significativo ($p < 0,05$), de aproximadamente 1,3 ciclos logarítmicos (tabela 2). Resultados diferentes foram observados por Bedani²¹, que verificou diminuição na população de bacteróides nas fezes de camundongos que ingeriram “iogurte” de soja complementado com o microrganismo *E. faecium*, em comparação com animais que não foram tratados com o probiótico.

Quando foram avaliadas as populações de *Bifidobacterium*, verificou-se que houve, para os grupos controle e probiótico, diminuição e aumento, respectivamente, do ciclo logarítmico (tabela 2). É importante ressaltar que somente o aumento da população, para o grupo controle, foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Esse resultado mostra que o microrganismo probiótico presente no iogurte, *Bifidobacterium animalis*, foi capaz de colonizar o intestino dos indivíduos pertencentes ao grupo probiótico, permanecendo viável.

O aumento na população de *Bifidobacterium* sp na microbiota fecal dos indivíduos que ingeriram iogurte probiótico é considerado fator positivo para a saúde do hospedeiro, sendo, em geral, um dos pontos relevantes observados na maioria da literatura consultada³⁸. Muitos aspectos positivos têm sido atribuídos a este gênero³⁹. As bifidobactérias são prevalentes no

intestino e podem prevenir a colonização deste por bactérias patogênicas⁴⁰. Estudos revelam que o aumento de bifidobactérias intestinais pode representar efeitos benéficos para o hospedeiro, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH intestinal, diminuição dos produtos de putrefação, inibição do crescimento de patógenos e imunomodulação^{41,42}.

Na tabela 2, pode-se observar que ocorreu diminuição de aproximadamente 1 ciclo logarítmico na população de *Lactobacillus* para o grupo controle e aumento de 0,5 ciclo logarítmico, para o grupo probiótico. Apesar dessas variações não terem sido estatisticamente significativas ($p > 0,05$), esse pequeno acréscimo para o grupo probiótico é satisfatório, uma vez que são várias as evidências que demonstram ou sugerem que essas bactérias colaboram para o bem-estar do homem através de mecanismos, tais como, aumento da resistência à colonização, implementação de defesas imunológicas, produção de vitaminas, inativação de substâncias cancerígenas e transformação de colesterol ao nível da mucosa intestinal³⁵. Estudo²¹ observou que camundongos que ingeriram suspensão de cultivo puro do microrganismo probiótico *E. faecium* e os pertencentes ao grupo que recebeu “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* apresentaram maiores populações de *Lactobacillus* sp, quando comparados com camundongos que não foram tratados com o probiótico.

O fornecimento de bactérias probióticas para a alteração da microbiota intestinal estabelecida em crianças e indivíduos adultos é processo mais complexo do que se supunha, pois, estes microrganismos têm se deparado com a estabilidade do ecossistema intestinal. Porém, uma vez que os nichos ecológicos do trato gastrointestinal estejam ocupados por comunidades bacterianas que se autorregulam, tornam-se extremamente difíceis a adesão de nova bactéria neste sistema. É importante ressaltar que estudos com probióticos têm mostrado que, apesar da aderência ao trato gastrointestinal, sua permanência ocorre apenas enquanto a suplementação é mantida⁴³, sendo necessária a ingestão diária recomendada.

4 Conclusão

O iogurte contendo o microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis*, apesar de ter propiciado aumento nas populações de *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp e *Enterococcus* sp, não foi eficiente na redução das populações de enterobactérias. Além disso, bactérias do gênero *Bacteroides* parecem ter sido estimuladas também pelo microrganismo probiótico. No grupo controle, pôde-se observar que, apesar de não significativa estatisticamente, houve diminuição do ciclo logarítmico nas populações de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, durante o tempo. Estudos adicionais devem ser realizados, testando-se outros probióticos e pesquisando-se mais espécies bacterianas.

Referências

1. Bourlioux P, Koletzko B, Guamer F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium: the intelligent intestine, held in Paris. American Journal of Clinical Nutrition. 2003;78:83-95.
2. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. Gut. 1998; 42:2-7.
3. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease.

- Gastroenterology. 1984;86:174-93.
4. Kirjavainen PV, Gibson GR. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Annals of Medicine*. 1999;31:92-288.
 5. Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70:94-189.
 6. Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*. 1998;8: 473-9.
 7. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2004;18(2):299-313.
 8. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 2001;11:1-17.
 9. Sanders ME. *Probiotics: considerations for human health. Nutrition Review*. 2003; 61(3):91-9.
 10. FAO/WHO. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London; 2002.
 11. Shah NP, Lankaputhra WEV. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal*. 1997;7:349-56.
 12. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, 1998;51(4):123-36.
 13. Jelen P, Lutz S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA G, ed. *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Lancaster: Technomic Publishing; 1998.
 14. Klaenhammer TR. Probiotics and prebiotics. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM; 2001.
 15. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;15:1-9.
 16. Tuohy KM, Robert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*. 2003;8(15):692-700.
 17. Fuller R. Probiotics in man and animals. *Journal Applied Bacteriology*. 1989;66:365-78.
 18. Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley; 1999.
 19. Oliveira MN, Sivieri K, Alegro JHA, Saad SMI. Aspecto tecnológico de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002; 38(1):1-21.
 20. Machado DF, Ferreira CLLF, Costa NMB, Oliveira TT. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003; 23(2):270-5.
 21. Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6:241-5.
 22. Bedani R. Influência do consumo de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos. Araraquara: UNESP; 2008.
 23. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *Journal of Nutrition*. 1994;124:18-23.
 24. Bouhnik Y, Flourie B, D'Agay-Abensour L, Porchat P, Gramet G, Durand M, Rambaud JC. Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *Journal Nutrition*. 1997;127:444-8.
 25. Edlund C, Beyer G, Hiemer-Bau M, Ziege S, Lode H, Nord CE. Comparative effects of mixifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2000;32:81-5.
 26. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*. 1983;72:317.
 27. Munoa FJ, Pares R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54:56-68.
 28. Brigidi P, Vitali B, Swennen E, Bazzocchi G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Research in Microbiology*. 2001;152:735-41.
 29. Livingston SJ, Kominos SD, Yee RB. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. *Journal of Clinical Microbiology*. 1978;7: 448-53.
 30. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela; 2007.
 31. Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric statistical inference*. New York: John Wiley & Sons; 1973.
 32. Franz CMAP, Stiles ME, Sheleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;80:105-22.
 33. ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.
 34. Vollard EJ, Clasener HAL. Colonization resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38: 409-14.
 35. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2008.
 36. Peach S, Fernandez F, Johnson K, Drasar BS. The nonsporing anaerobic bacteria in human faeces. *Journal of Medical Microbiology*. 1974;7: 213-21.
 37. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;360:512-8.
 38. Atobe, JH. Efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana. São Paulo: USP; 2003.
 39. Setoyama H, Imaoka A, Ishikawa H, Umetsaki Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes and Infection*. 2003;5:115-22.
 40. Lim KS, Huh CS, Baek YJ. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*. 1993;76:2168-74.
 41. Mitsuoka T. *Bifidobacteria* and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*. 1990;6:263-8.
 42. Rubio LA, Spencer R, Grant G, Pusztai A. The inclusion of lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal or its fibre residue in the diet reduces the levels of *Escherichia coli* in both small and large intestines of the rats. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1995;8:101-5.
 43. Tannock GW. The normal microflora: an introduction. In: Tannock GW, ed. *Medical importance of normal microflora*. Netherlands: Kluwer; 1999.
- 62 Martin AC, Olivieri CK, Aguiar RS, Aragon DC, Santini MSS, Santana EHW, Aragon-Alegro LC / UNOPAR Cient., *Ciênc. Biol. Saúde*. 2009;11(4):59-62