

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA

**PARÂMETROS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE
BACTÉRIAS BÍFIDAS ISOLADAS DE RECÉM-NASCIDOS,
COM INDICAÇÃO DE USO COMO PROBIÓTICO EM BANCOS
DE LEITE HUMANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS -BRASIL
2006

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA

**PARÂMETROS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE
BACTÉRIAS BÍFIDAS ISOLADAS DE RECÉM-NASCIDOS,
COM INDICAÇÃO DE USO COMO PROBIÓTICO EM BANCOS
DE LEITE HUMANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 5 DE MAIO DE 2006

**Prof. Antônio Fernandes de
Carvalho**

**Profª Izabel Regina dos S. Costa
Maldonado**

**Prof. José Ivo Ribeiro Júnior
(Conselheiro)**

**Profª Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)**

**Profª Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)**

Aos meus pais

Abel e Lúcia

Aos meus irmãos

Mariana e Leandro

Ao Dinarte

Aos meus avós Odilon e Carlita e ao meu primo Igor

AGRADECIMENTO

À Deus, por tudo na minha vida.

Aos meus pais Abel e Lúcia pelo amor incondicional, carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida

Aos meus irmãos Mariana e Leandro, pelo carinho e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dinarte, pelo carinho, dedicação, e pela companhia durante os inúmeros finais de semana no Bioagro e por sempre estar presente nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

A professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, pela orientação, ensinamentos, oportunidades, e amizade ao longo desses anos.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, pela competência, paciência e valiosa ajuda profissional no desenvolvimento desse trabalho.

A professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela receptividade e boa vontade em participar desse trabalho.

A professora Izabel, pelo apoio, carinho, disponibilidade e valiosa contribuição na realização desse experimento.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovanni, pelo carinho, atenção e constantes ensinamentos .

A Maria da Penha Piccolo Ramos, pela amizade e valiosa ajuda na realização desse trabalho.

As minhas estagiárias (o) e grandes amigas Flávia, Karina, Elisângela, Carolina, Mariana, Tobias e Natália pelo apoio, dedicação e preciosa ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de culturas láticas, José Manoel, Natan, Célio, Juliana pela colaboração, companheirismo e bons momentos passados juntos.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Vaninha, Geralda, Lúcia, Dona Lígia, Sr. Manoel, Sr Luis, Dimas, Célio, Adão, Pio, Osvaldo, Fernando, Valério, Juarez, Sr Zé, Tiago.

Aos funcionários do BIOAGRO, em especial o Sr Paulo e Sr Toninho pela colaboração, carinho e ajuda durante o desenvolvimento desse experimento.

Aos colegas do Departamento de Nutrição, Cassiano, Pâmela, Jôse pelo carinho, dedicação e ajuda durante todo o experimento com os ratos.

A meu avô Odilon Rodrigues e ao meu primo Igor R. da Silva, mesmo não estando mais entre nós, tenho certeza que torceram muito por mim.

A minha avó Carlita, minhas tias, tios, primos e primas pelo apoio e carinho.

Ao casal Maria e Vicente Lelis, pelo carinho, apoio e incentivos constantes.

A Denilce, pelo carinho, apoio e descontração durante todos esses anos.

Ao meu mais novo irmão Mário (Chumbinho), pelo despreendimento e valiosa ajuda

A minha amiga Edith, pela amizade incondicional.

Aos colegas da pós graduação pela amizade, convívio e troca de experiências.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA, filha de Abel Fernandes da Cunha e Lúcia Maria Rodrigues da Cunha, nasceu em 23 de novembro de 1980, em Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2004, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa - MG.

Em março de 2004, iniciou o Programa de Pós- Graduação, em nível de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, MG, realizando seus estudos na área de probióticos e culturas lácticas.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Probióticos e Saúde Humana.....	4
2.2. Importância de Bactérias Probióticas no Desenvolvimento da Microbiota Intestinal Benéfica	6
2.2.1. Importância do Leite Materno no Desenvolvimento de Bactérias Bífidas no Intestino	7
2.2.2. Leite Materno e seu Papel na Saúde da Criança.....	8
2.2.3. Bancos de Leite Humano.....	10
2.2.4. Bactérias Bífidas	12
2.2.5. Efeitos Benéficos Conferidos por Bactérias Bífidas	13
2.3. Segurança dos Microrganismos Probióticos	14
2.3.1. Sensibilidade a Antibióticos.....	15
2.3.1.1. Principais Classes de Antibióticos	17
2.3.1.1.1. Antibióticos -Lactâmicos.....	17
2.3.1.1.1.1. Penicilinas	17
2.3.1.1.1.2. Cefens (cefalosporina).	19
2.3.1.1.1.3. Carbapenêmicos	20
2.3.1.1.1.4. Monobactanos.....	21
2.3.1.1.2. Antibióticos Glicopeptídicos	21
2.3.1.1.3. Antibióticos Aminoglicosídicos	22
2.3.1.1.4. Macrolídeos	23
2.3.1.1.5. Sulfonamidas	24
2.3.2. Antagonismo de Bactérias Probióticas sobre Patógenos....	25
2.3.2.1. Produção de ácidos orgânicos	25
2.3.2.2. Produção de bacteriocinas e/ou moléculas semelhantes à bacteriocinas.....	27
2.3.2.3. Produção de H ₂ O ₂	29
2.3.2.4. Imunomodulação	30
2.3.3. Translocação bacteriana	31
2.3.3.1. Supercrescimento Bacteriano.....	32
2.3.3.2. Deficiências das defesas imunológicas do hospedeiro ..	34
2.3.3.3. Injúria da mucosa intestinal	35

CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal	38
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Origem e Manutenção dos isolados de bactérias bífidas.....	39
3.2. Ativação dos Isolados	40
3.3. Perfil de Sensibilidade aos Antibióticos.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Perfil de Sensibilidade a Antibióticos	41
5. CONCLUSÃO	49
 CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos	50
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. OBJETIVOS.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. Origem e manutenção dos isolados de <i>Bifidobacterium breve</i>	51
3.2. Ativação dos isolados de <i>Bifidobacterium breve</i>	52
3.3. Origem, manutenção e ativação dos microrganismos patogênicos indicadores.....	52
3.4. Avaliação do efeito antagonista	52
3.4.1. Difusão em placas	53
3.4.2. Teste “Spot”	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Antagonismo pelo método difusão em placas.....	54
4.2. Antagonismo pelo método “spot”	55
5. CONCLUSÃO	59
 CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas	60
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. OBJETIVO GERAL.....	62
2.1. Objetivos específicos	62
3. MATERIAL E MÉTODOS	62

3.1. Origem e manutenção dos isolados.....	62
3.2. Determinação do <i>pool</i> probiótico.....	63
3.2.1. Resistência a sais biliares e ao suco gástrico	63
3.2.2. Sensibilidade a antibióticos	63
3.3. Ativação dos isolados	64
3.4. Compatibilidade dos isolados de bactérias bífidas.....	64
3.4.1. Ensaio pelo método “Spot”	64
3.4.2. Ensaio Difusão em placas	65
3.5. Coleta do leite materno	65
3.6. Preparo do concentrado bacteriano	66
3.7. Toxicidade oral crônica e translocação bacteriana	67
3.7.1. Avaliação da toxicidade por índice de peso do órgãos.....	68
3.7.2. Avaliação da translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço.....	68
3.7.3. Caracterização das bactérias translocadas.....	69
3.7.3.1. Perfil de fermentação de carboidratos das bactérias translocadas.....	69
3.7.4. Análise Estatística	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Composição do <i>pool</i> probiótico.....	71
4.2. Compatibilidade dos isolados.....	72
4.3. Número de células viáveis no <i>pool</i> de bactérias bífidas do concentrado	72
4.4. Avaliação da toxicidade por índice de peso dos órgãos	72
4.5. Translocação bacteriana para diferentes órgãos	76
4.5.1. Contagem de bactérias anaeróbias no fígado, rins, coração e baço.....	76
5. CONCLUSÃO	81
CONCLUSÃO GERAL	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1: Penicilinas naturais (TORTORA et al., 2000).....	18
Figura 2: Penicilinas semi-sintéticas (TORTORA et al., 2000).....	19
Figura 3: Estrutura química da Cefalosporina.....	20
Figura 4: Estrutura química do meropenem.....	21
Figura 5: Estrutura química do aztreonam.....	21
Figura 6: Estrutura química da vancomicina.....	22
Figura 7: Estrutura do antibiótico gentamicina (TORTORA 2000).	23
Figura 8: Estrutura do antibiótico eritromicina (TORTORA et al., 2000).	24
Figura 9: Comparação entre as estruturas do PABA e da sulfonamida (TORTORA et al., 2000).	25
CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal	38
Figura 1: Susceptibilidade da estirpe UFVCC 1083 a alguns dos agentes antimicrobianos avaliados.....	47
CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos	50
Figura 1: Atividade antagonista de bactérias bífidas isoladas de recém nascidos a <i>Salmonella typhimurium</i> pela técnica difusão em placas (a) e “spot” (b).	55
CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas	60
Figura 1: Elaboração do <i>pool</i> de leite humano pasteurizado acrescido de bactérias bífidas (LPB) ou não (LP).	66
Figura 2: Estimativas dos índices do fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite humano pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico. 73	
Figura 3: Pesos de ratos “Wistar” do grupo basal (T0), controle, e daqueles tratados com leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico por 21 dias.....	75
Figura 4: Estimativas das contagens Log (UFC/mL) de bactérias anaeróbias totais no fígado (a), rins (b), coração (c) e baço (d) de ratos “Wistar” no tempo 0 (Basal) e após 21 dias recebendo leite pasteurizado acrescido (LPB) ou não (LP) de probiótico.	77

ÍNDICES DAS TABELAS

CAPÍTULO 1: Perfil de Sensibilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> aos Principais Antimicrobianos Utilizados em UTI- Neo Natal	38
Tabela 1: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil.....	42
Tabela 1a: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont).....	43
Tabela 1b: Susceptibilidade das estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de recém nascidos aos principais agentes antimicrobianos utilizados em UTIs-Neo-Natal no Brasil (cont).....	44
Tabela 2: Susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de fezes de recém nascidos.....	45
CAPÍTULO 2: Atividade Antagonista de Bactérias Bífidas Sobre Patógenos	50
Tabela 1: Número de estirpes de bactérias bífidas que apresentaram antagonismo aos patógenos testados.	56
CAPÍTULO 3: Estudo da Toxicidade Oral Crônica e Translocação Bacteriana de Estirpes de <i>Bifidobacterium breve</i> Potencialmente Probióticas	60
Tabela 1: Características de <i>Bifidobacterium breve</i> isoladas de crianças	71
Tabela 2: Estimativa dos contrastes envolvendo os índices dos órgãos e peso dos animais avaliados.....	73
Tabela 3: Estimativa dos contrastes envolvendo o Log do número de células (UFC/g) nos órgãos dos animais avaliados.....	77
Tabela 4: Caracterização de bactérias* anaeróbias totais translocadas para os diferentes órgãos analisados pelo perfil de fermentação de carboidratos (Kit API CH 50 - BioMerieux – France).	78

RESUMO

CUNHA, Luciana Rodrigues da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2006. **Parâmetros de segurança e funcionalidade de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos, com indicação de uso como probiótico em bancos de leite humano.** Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e José Ivo Ribeiro Júnior.

O objetivo desse trabalho foi avaliar alguns parâmetros de segurança e funcionalidade atualmente recomendados para validação de novas estirpes de *Bifidobacterium breve*, isoladas de recém nascidos com potencial de uso como probiótico em bancos de leite humano. Foram avaliados susceptibilidade antimicrobiana, antagonismo a patógenos, toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. A experimentação foi dividida em três fases. Na primeira, avaliou-se a susceptibilidade de 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* aos principais antimicrobianos (14) utilizados em UTI-neonatal nas instituições brasileiras. Na segunda fase, avaliou-se o antagonismo das estirpes sobre o crescimento de *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, utilizando-se a técnica “spot” e difusão em placas. Para excluir o efeito inibitório dos ácidos orgânicos realizou-se também o teste “spot” em meio tamponado com bicarbonato de sódio. Baseado nos resultados encontrados no teste de sensibilidade a antibióticos e naqueles de resistência a sais biliares e suco gástrico obtidos em estudos anteriores, foram selecionadas sete estirpes para comporem o *pool* probióticos que foi utilizado para verificação da toxicidade oral crônica e translocação bacteriana, na terceira fase do experimento, na qual empregou-se em cada repetição, 16 ratas Wistar com 21 a 23 dias de vida, recém desmamadas, que foram divididas em quatro grupos por unidade experimental: Basal, Controle, LP (Leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado

acrescido de bactérias bífidas). Os quatro animais que compuseram o grupo basal foram sacrificados no primeiro dia da experimentação (T0) e aqueles dos outros grupos foram alimentados diariamente (0,1 mL) via oral com auxílio de micropipeta esterilizada com diferentes dietas, durante 21 dias e posteriormente sacrificados. Fígado, rins, coração e baço, foram removidos, pesados e testados para verificação da toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. O experimento foi realizado em três repetições. Verificou-se que as 31 estirpes de *Bifidobacterium breve* foram resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, amicacina e gentamicina, dentre os 14 antibióticos avaliados. Para os outros antimicrobianos, a sensibilidade variou de 2% (sulfonamida) a 100% (vancomicina, amoxicilina, ampicilina e penicilina). Esses mesmos isolados apresentaram variabilidade na atividade antagonística sobre o crescimento dos diferentes patógenos avaliados pelo método “spot”. Essa inibição foi estirpe dependente e não promovida somente por ácidos orgânicos, uma vez que não foi totalmente revertida quando utilizou-se meio tamponado. O sobrenadante livre de células de bactérias bífidas não promoveu inibição dos patógenos avaliados. Verificou-se que as estirpes de *Bifidobacterium breve* selecionadas (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 e 1111) não promoveram efeito adverso na saúde dos animais testados, uma vez que não induziram toxicidade oral crônica e nem translocação de bactérias do trato gastrointestinal para o fígado, rins coração e baço após os 21 dias da experimentação. No entanto, sugere-se a realização dos mesmos testes aqui avaliados com outros mamíferos, como coelhos, macacos e humanos para confirmar a segurança de uso desses isolados.

ABSTRACT

CUNHA, Luciana Rodrigues da, M. S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2006. **Parameters of security and functionality of the *Bifidobacterium* isolated from newborn, with potential of use as probiotics in human milk banks.** Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa and José Ivo Ribeiro Júnior.

The objective of this study was to evaluate some parameters of security and functionality currently recommended for validation of probiotics. The parameters evaluated were antimicrobial susceptibility, antagonism to the growth of pathogens, oral chronic toxicity and bacterial translocation of new lineages of *Bifidobacterium breve* isolated from newborn, with potential of use as probiotics in human milk banks. The experiments were divided in three parts. In the first one, the susceptibility of 31 lineages of *Bifidobacterium breve* to the most common antimicrobials (14) used in UTI-neonatal from Brazilian institutions was evaluated. In the second part, the antagonism to the growth of lineages of *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was evaluated using the "spot" technique and plate diffusion. To exclude the effect of organic acid inhibition, the 'spot' test was also performed in buffered sodium bicarbonate medium. Based in the results found in the test of antibiotics sensitivity and in those of resistance to bile salts and gastric juice from previous studies, seven lineages were selected to compose the *pool* of probiotics that was used for verification of the oral chronic toxicity and bacterial translocation, in the third phase of the experiment, in which it was used for each replication 16 wearing Wistar rats with 21-23 days of life, were divided in 4 groups: Basal, Control, LP (pasteurized human milk) and LPB (pasteurized human milk containing bifid bacterium). The four animals that composed the basal group were sacrificed in the first day of the experiment (T0) while the others were fed with different

diets during 21 days and sacrificed later. Liver, kidneys, heart, and spleen were removed, weighed and tested for oral chronic toxicity and bacterial translocation. The experiment was conducted in three repetitions. It was found that the 31 lineages of *Bifidobacterium breve* were resistant to antimicrobial ciprofloxacin, ampicillin and gentamicin, among the 14 antibiotics evaluated. For the other antimicrobials, sensitivity varied from 2% (sulfonamide) to 100% (vancomycin, amoxicillin, ampicillin and penicillin). These same isolated varied in the antagonistic activity on the growth of the different pathogens evaluated by the "spot" method. This inhibition was lineage-dependent and not only promoted by organic acids, as it was not totally reverted in the buffered medium. The supernatant free of bifid bacteria cells did not promote inhibition of the pathogens evaluated. It was verified that the selected lineages of *Bifidobacterium breve* (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 and 1111) did not promote adverse effect in the animal health. Similarly, they did not induce oral chronic toxicity or translocation of bacteria of the gastrointestinal tract to the liver, kidneys, heart and spleen after 21 days of experimentation.

1. INTRODUÇÃO

A excelência do aleitamento materno é mundialmente reconhecida. O leite humano supre as necessidades nutricionais e energéticas do recém-nascido e o protege contra infecções (HEINIG, 2001). Apesar dos inúmeros benefícios conferidos por este alimento, muitas crianças (sadias e/ou prematuras) são privadas de ingeri-lo, pois, suas mães, pelos mais diferentes motivos não podem amamentá-las. Assim, os bancos de leite humano têm desempenhado um papel fundamental no fornecimento de leite para esses indivíduos (GIUGLIANI, 2002).

Por ser facilmente contaminado e veículo de várias doenças infecciosas, os bancos de leite humano tomam uma série de medidas de segurança para garantir a qualidade e inocuidade da matéria prima ali disponível (ARNOLD & LARSON, 1993). A pasteurização é uma prática de rotina nestes estabelecimentos e visa a eliminação de bactérias e vírus, potencialmente patogênicos. Entretanto, BORBA et al. (2003) constataram que esse processo reduz alguns constituintes do leite que podem ser imprescindíveis para o estabelecimento do gênero *Bifidobacterium* no trato intestinal dos recém nascidos, prejudicando, portanto, a formação de uma microbiota benéfica para os mesmos.

O desenvolvimento de uma microbiota predominantemente benéfica contribui para saúde do hospedeiro. Bactérias bífidas desempenham importante papel na manutenção do equilíbrio intestinal (KOPP-HOOLIHAN, 2001) e na prevenção da colonização de microrganismos patogênicos, por meio da produção de compostos inibidores (ácidos orgânicos e bacteriocinas), competição por nutrientes e sítios de adesão no epitélio intestinal, e modulação da resposta imune (FOOKS & GIBSON, 2002). Estudos têm mostrado resultados promissores alcançados pela administração de bactérias bífidas como por exemplo, proteção contra infecções intestinais (HARSHARNJIT, 2003), câncer de cólon (COMMANE et al., 2005), redução do colesterol (MODLER, 1994; LIN & CHEN, 2000), aumento da utilização da lactose por indivíduos intolerantes (GRIFFIN et al., 2002), efeito anti-tumor (SREEKUMAR, 2003), melhoria no metabolismo de proteínas e vitaminas (ARUNACHALAM, 1999, YOUNG & HUFFMAN,

2003). bem como estimulação do sistema imune (KALLIOMAKI et al., 2001; ISOLAURI, 2001).

Uma possível forma de compensar a inativação dos fatores bifidogênicos pela pasteurização, e uma vez que o tratamento térmico é um procedimento necessário, seria a adição direta de bactérias bífidas no leite pasteurizado nos bancos. Assim, as crianças ao invés de ingerir os fatores que estimulariam o crescimento de bactérias bífidas no intestino receberiam a espécie probiótica (BORBA, 2003).

Bifidobacterias têm longa história de uso seguro em produtos fermentados (SHORTT, 1999). Entretanto, nos últimos anos, alguns relatos têm identificado bactérias do ácido láctico probióticas, como por exemplo *Bifidobacterium breve* em meningite neonatal (HATA, et al., 1988; NAZAKAWA et al., 1996) e *Bifidobacterium longum* em casos de septicemia (YIM Há et al., 1999). No entanto, em nenhum dos casos foi comprovada a relação da infecção com o consumo do probiótico. Essas situações têm aumentado o interesse e o questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação às novas estirpes que estão sendo introduzidas na cadeia alimentar humana. Aspectos de segurança, como origem das estirpes utilizadas, ausência de histórico de patogenicidade e de associação com doenças para o gênero, ausência de genes de resistência a antibióticos, dentre outros, são importantes critérios para a seleção de uma estirpe probiótica antes de sua incorporação aos produtos alimentícios (SAARELA et al., 2000). Outro aspecto de segurança recomendado é a verificação da toxicidade da estirpe, constatada de forma indireta por meio do crescimento anormal de alguns órgãos e sua capacidade de translocar para sítios extra-intestinais ou induzir translocação da microbiota intestinal endógena (ZHOU et al., 2000a).

A susceptibilidade antimicrobiana de novos isolados visa prevenir a entrada de estirpes resistentes a antibióticos na cadeia alimentar, e conseqüentemente, a disseminação da resistência para microrganismos patogênicos, uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos em humanos e promotores de crescimento em animais têm promovido a emergência de vários microrganismos resistentes (AUSTIN, 1999) causando sérios problemas no tratamento de infecções intestinais.

A avaliação da translocação bacteriana é importante uma vez que este é o primeiro passo no processo de infecções provocadas por microrganismos endógenos oportunistas (BERG, 1983). Muitos desses microrganismos, após atravessarem a barreira intestinal, podem se alojar nos nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço dentre outros, podendo desencadear septicemia, choque ou até mesmo levar a falência múltipla dos órgãos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). Estudos indicam que esse fenômeno é observado com mais freqüência por bactérias Gram-negativas e anaeróbias facultativas do que com anaeróbias obrigatórias e organismos Gram-positivos. *A priori*, a capacidade de bactérias probióticas translocarem do trato gastrointestinal para outros sítios não é desejável, uma vez que se desconhece qual o mecanismo envolvido nesta translocação e suas implicações para o hospedeiro (BENGMARK, 1998).

Tendo em vista o exposto acima e a implantação de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém nascidos em bancos de leite humano, esse trabalho objetivou avaliar alguns parâmetros de segurança e funcionalidade atualmente recomendados tais como, susceptibilidade antimicrobiana, antagonismo ao crescimento de patógenos, toxicidade oral crônica e translocação bacteriana. Para tal, o estudo foi dividido em três fases em que a primeira objetivou-se selecionar dentre as estirpes de *Bifidobacterium breve* já isoladas de crianças, as mais sensíveis aos principais antibiogramas utilizados em UTIs neo-natal. A segunda fase teve como objetivo verificar a atividade antagonista “*in vitro*” de *Bifidobacterium breve* ao crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*. Na terceira fase, procurou-se verificar o efeito da concentração de bactérias bífidas (10^9 UFC/ mL) ministradas diariamente aos ratos por 21 dias na translocação bacteriana para o fígado, rins, coração e baço e a toxicidade oral crônica desses isolados.