



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**PRISCILA BONEVENTI**

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE LACTOBACILLUS POR  
ARDRA E DESENVOLVIMENTO DE LEITE PROBIÓTICO A  
PARTIR DE UM DOS ISOLADOS**

---

Londrina  
2008

**PRISCILA BONEVENTI**

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE LACTOBACILLUS POR  
ARDRA E DESENVOLVIMENTO DE LEITE PROBIÓTICO A  
PARTIR DE UM DOS ISOLADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós\_Graduação Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva  
Miglioranza

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia

Londrina  
2008

**PRISCILA BONEVENTI**

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE LACTOBACILLUS POR  
ARDRA E DESENVOLVIMENTO DE LEITE PROBIÓTICO A  
PARTIR DE UM DOS ISOLADOS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza

---

Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza

---

Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Dói

Londrina, 05 de agosto de 2008.

## Dedicatória

A Deus, aos meus pais, Sonia e Domingos,  
e ao meu marido, Daphnis, pelo amor, apoio  
e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me ama acima de tudo e nunca me desampara nos momentos em que mais preciso Dele;

A professora Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena da Silva Miglioranza, minha orientadora, e o professor Dr. José Eduardo Garcia, meu co-orientador, pela orientação, amizade, ensinamentos e por toda atenção dedicada a este trabalho;

Aos meus pais, Sonia e Domingos, por todo carinho, amor e incentivo depositados em mim, sempre me ajudando a seguir em frente e a nunca desistir dos meus sonhos;

Ao meu marido, Daphnis, por toda compreensão e amor, sempre me incentivando e apoiando nos momentos que eu mais precisei;

As minhas estagiárias, Juliana de Lima Santoro e Poliana Macedo Guimarães, pela valiosa ajuda neste trabalho e pela presente amizade;

Aos colegas de turma, pelos momentos felizes compartilhados em laboratório, na sala de aula ou fora dela e outros, em especial a Valéria O. Brito e Giselle Aparecida Nobre Costa, pela grandiosa ajuda nos momentos de dúvidas e incertezas;

A todos os professores do curso de mestrado em ciência de alimentos pelos ensinamentos;

Aos técnicos do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Dra. Elza Youssef, Berenice Figueiredo, Nelson Heitor Fuzinato e Patrícia Sambatti pela contribuição durante a execução do trabalho prático;

À secretária, Sandra Rezende, por toda ajuda, sempre que necessária durante o mestrado;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Nunca, jamais,**

**desanimeis,**

**embora venham ventos contrários.”**

**(Santa Paulina)**

BONEVENTI, Priscila. **Identificação Específica de Lactobacillus por ARDRA e Desenvolvimento de Leite Probiótico a Partir de um dos Isolados.** 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

A utilização de novos isolados de *Lactobacillus* com características probióticas impõe uma seqüência de testes bioquímicos que visam à verificação do potencial biotecnológico destas linhagens. Testes bioquímicos permitiram selecionar 08 linhagens com características probióticas isoladas de fezes de crianças saudáveis da creche da Universidade Estadual de Londrina. No presente trabalho, essas linhagens foram identificadas molecularmente através da técnica de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e um isolado foi escolhido para a obtenção de um produto probiótico. Amplificou-se a região intergênica 16S - 23S do DNA ribossomal extraído dos isolados por PCR e os produtos foram submetidos à hidrólise com 11 enzimas de restrição. Os produtos desta reação foram verificados em eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo 20mg/ml sob incidência de luz ultravioleta e fotodocumentado. As linhagens foram então, identificadas quanto as suas espécies como *Enterococcus faecalis* (2), *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* (04) e *Bifidobacterium lactis* e uma das linhagens de *Lactobacillus plantarum* foi submetida a estudo em leite desnatado reconstituído a 9,0%, no qual foram definidos os parâmetros de obtenção de um produto probiótico, o qual foi avaliado quanto às condições de crescimento, concentração e viabilidade dos microrganismos durante 60 dias de armazenamento a 5°C, bem como teste microbiológico para controle de qualidade. O leite probiótico atingiu uma acidez titulável máxima de 0,31%, não sendo considerado um leite fermentado por não ter atingido o mínimo de acidez preconizado pela legislação brasileira que é de 0,60%. A concentração de células viáveis manteve-se acima de 10<sup>7</sup> UFC/ml durante o período de armazenamento, acima do mínimo recomendado pela legislação que é de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Seis marcas de leites fermentados comerciais foram avaliadas quanto ao pH, a acidez titulável, a concentração e a viabilidade dos microrganismos presentes. Todas as marcas se apresentaram dentro das normas exigidas pela legislação brasileira vigente quanto aos padrões para leite fermentado. A linhagem identificada como *Lactobacillus plantarum* apresentou características favoráveis à produção de um leite probiótico, atingindo uma concentração de células viáveis acima de 10<sup>7</sup> UFC/ml e mantendo essas contagens por no mínimo 60 dias durante a estocagem a 5°C.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus plantarum*. 16S. 23S. PCR.

BONEVENTI, Priscila. **ARDRA Specific Identification of Lactobacillus and Development of Probiotic Milk With one of the Isolated Strains**. 2008. 73p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

The use of new isolates of characteristic probiotic Lactobacillus requires a sequence of biochemical tests aiming to verify the biotechnological potential of these strains. Biochemical tests allowed selecting 08 probiotic strains isolated from healthy children's feces in a day care center at the State University of Londrina. In this research, these strains have been molecularly identified through the technique of ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) and an isolated was chosen to obtain a probiotic product. The 16S–23S Ribosomal DNA intergenic spacers regions were extracted from the isolated by PCR and the products were submitted to hydrolysis with 11 restriction enzymes. The products of this reaction were electrophoresed in a 2.0% agarose gel, stained with ethidium bromide 20mg/ml, verified by ultraviolet light transillumination and photo documented. The strains were then identified as belonging to *Enterococcus faecalis* (2), *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* (04) and *Bifidobacterium lactis* species and one of the strains of *Lactobacillus plantarum* was used in this study. The strain was applied in a 9.0% w/w solids reconstituted skimmed milk to define the parameters for obtaining a probiotic product, which was evaluated for the conditions of culture growth, microorganisms' concentration and viability for 60 storage days at 5°C, and microbiological testing for quality control. The probiotic milk reached a maximum titratable acidity of 0.31% and is not considered fermented milk according to the Brazilian legislation that is 0.60%. The concentration of cells remained above of 10<sup>7</sup> CFU/ ml during the storage period, which is above the minimum recommended by the legislation, which is 10<sup>6</sup> CFU/ ml. Six commercial fermented milk were assessed for pH, titratable acidity, concentration and viability of probiotic microorganisms present. All of them were found within the standards required by Brazilian law for fermented milk. The strain identified as *Lactobacillus plantarum* presented favorable characteristics for a probiotic milk development, reaching a concentration of cells above 10<sup>7</sup> CFU/ ml and maintaining these counts by at least 60 storage days at 5°C.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*. 16S. 23S. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –Sítios de clivagem do DNA pelas enzimas EcoRI e HindIII.....	35
<b>Figura 2</b> –Fluxograma do leite probiótico produzido com a linhagem L20 .....	45
<b>Figura 3</b> –Foto da hidrólise com a enzima EcoRI.....	50
<b>Figura 4</b> –Foto da hidrólise com a enzima SspI.....	50
<b>Figura 5</b> –Duas repetições do leite probiótico produzido .....	52
<b>Figura 6</b> –Média dos resultados das análises de pH dos três leites probióticos com a linhagem L20.....	52
<b>Figura 7</b> –Média dos resultados das análises de acidez titulável dos três leites probióticos com a linhagem L20 .....	53
<b>Figura 8</b> –Contagem de células viáveis (técnica “pour-plate”) de <i>L. plantarum</i> após 48 horas de incubação .....	55
<b>Figura 9</b> –Média dos resultados das análises de pH dos leites fermentados comerciais .....	58
<b>Figura 10</b> –Média dos resultados das análises de acidez titulável dos leites fermentados comerciais.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Organismos utilizados como probióticos na indústria alimentar e agrícola.....	21
<b>Tabela 2</b>	– Espécies de bactérias ácido-lácticas mais utilizadas em preparações probióticas .....	21
<b>Tabela 3</b>	– Limites de tolerância para padrões microbiológicos para um leite fermentado .....	39
<b>Tabela 4</b>	– Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de PCR.....	41
<b>Tabela 5</b>	– Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de hidrólise .....	42
<b>Tabela 6</b>	– Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de hidrólise com BSA....	43
<b>Tabela 7</b>	– Resultados das reações de hidrólise das oito amostras de DNA analisados .....	47
<b>Tabela 8</b>	– Padrão de digestão de espaçadores intergênicos curtos 16S - 23S em diferentes espécies de Lactobacillus.....	48
<b>Tabela 9</b>	– Padrão de digestão de espaçadores intergênicos curtos 16S - 23S em diferentes espécies de Bacteroides, Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Escherichia, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Propionibacterium, Staphylococcus, Streptococcus e Weissella.....	49
<b>Tabela 10</b>	– Média dos resultados das análises de células viáveis das três repetições produzidas de leite probiótico .....	54
<b>Tabela 11</b>	– Leites fermentados comercializados nos supermercados de Londrina – PR.....	59
<b>Tabela 12</b>	– Resultados médios da análise de células viáveis dos leites fermentados comerciais.....	60

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
4.1 O TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO .....	15
4.2 PROBIÓTICOS .....	17
4.2.1 Segurança dos Probióticos.....	22
4.2.2 Morfologia e Fisiologia dos Lactobacilos .....	24
4.2.3 Resistência ao Trato Gastrointestinal .....	25
4.2.3.1 Sais Biliares .....	25
4.2.3.2 Fenol .....	26
4.2.3.3 Acidez.....	27
4.2.4 Resistência a Antimicrobianos .....	27
4.2.5 Produção de Substâncias Antimicrobianas.....	29
4.3 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	30
4.3.1 ARDRA .....	33
4.3.1.1 PCR.....	34
4.3.1.2 Enzimas de Restrição .....	34
4.4 PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO .....	36
4.4.1 Espécies Empregadas .....	37
4.4.2 Controle de Qualidade.....	38
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	40
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	40
5.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S - 23S POR PCR.....	41
5.3.1 Enzimas .....	42

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	43
5.5 DESENVOLVIMENTO DO LEITE PROBIÓTICO.....	44
5.6 ANÁLISES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS.....	46
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	47
6.2 DESENVOLVIMENTO DO LEITE PROBIÓTICO.....	50
6.3 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS.....	57
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A comunidade microbiana que habita o trato gastrointestinal de um indivíduo é caracterizada por sua alta densidade populacional, ampla diversidade e interações complexas (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999), mas o funcionamento de todo esse sistema e das interações existentes nele ainda não são bem conhecidos.

No intestino, existem espécies de bactérias que são nocivas e podem causar problemas de saúde como, diarreia, infecções, tumores, danos ao fígado e até putrefação intestinal, mas existem também espécies que são benéficas e inibem o crescimento das bactérias nocivas, melhoram a digestão e a absorção de nutrientes, possuem efeito anticancerígeno, ajudam na síndrome do intestino irritável, processos alérgicos ocasionados por alguns alimentos, entre outros efeitos, promovendo, dessa maneira, a saúde do hospedeiro.

Em 1907, Ilya Ilyich Metchnikoff, microbiologista russo do Instituto Pasteur de Paris, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1908 e um dos precursores da moderna Biologia Celular, desenvolveu uma teoria, na qual o efeito dos microrganismos patogênicos do trato gastrointestinal humano poderia ser minimizado pela ingestão de microrganismos benéficos vivos. Em seus estudos, Metchnikoff atribuiu a longevidade dos camponeses búlgaros ao grande consumo de leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, hoje conhecido como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Assim, iniciou-se o conceito de modificação da atividade da microflora intestinal pela ingestão de leites fermentados (FOOKS; GIBSON, 2002).

As bactérias ácido-láticas utilizadas atualmente para a produção de leites fermentados pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, entre outros, e são assim denominadas por fermentarem açúcares simples, produzindo o ácido lático como principal produto do seu metabolismo (FARIA; BENEDET; LE GUERROUE, 2006).

A ingestão de bactérias benéficas presentes em diversos produtos lácteos colabora para impedir a fixação de microrganismos patogênicos no intestino. Portanto, os probióticos definidos por Fuller (1989) como suplementos alimentares microbianos que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora do balanço microbiano intestinal, têm sido utilizados com esta finalidade. Existem muitos efeitos ocasionados pela colonização das bactérias probióticas no intestino, entre eles podemos citar: redução dos efeitos adversos observados na intolerância à lactose, controle das infecções intestinais, supressão de tumores,

diminuição da concentração de colesterol e conseqüentemente menor incidência de doenças coronárias, melhor digestão, efeitos nutricionais e estimulação do sistema imune (FOOKS et al., 1999), assim como, diminuição do índice e sintomas de quadros diarreicos e constipação intestinal.

Para que as bactérias probióticas sobrevivam ao trânsito no trato gastrointestinal elas precisam ser capazes de resistir a um baixo pH e a acidez do estômago, tolerar as concentrações de sais biliares presentes no intestino e também conseguir se aderir às células da mucosa intestinal, beneficiando desta maneira o seu hospedeiro.

Johansson et al. (1993) forneceram uma sopa probiótica de aveia à base de lactobacilos para voluntários e constataram que somente 5 linhagens das 19 administradas persistiram no jejuno e cólon 11 dias após o término da administração, sendo as bactérias mais encontradas *L. plantarum* (85%), *L. rhamnosus* (23%) e *L. reuteri* (23%).

Pozza (2006) isolou e caracterizou, através de técnicas bioquímicas (resistência aos sais biliares, tolerância a condições ácidas e ao fenol), 30 linhagens de bactérias, sendo que 8 apresentaram potencial de utilização como probiótico, entretanto tais linhagens foram identificadas apenas como *Lactobacillus* spp., pois as técnicas utilizadas não permitiram uma identificação específica. Então, para se identificar as espécies, foi utilizada a metodologia de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), que consiste em utilizar a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e digerir seus produtos com enzimas de restrição específicas. Esta técnica é mais fácil, rápida e precisa do que as metodologias baseadas no perfil de fermentação usados na maioria dos laboratórios para propor a identificação destas bactérias em diferentes estudos (MOREIRA et al., 2005).

## 2 JUSTIFICATIVA

A utilização de novos isolados de *Lactobacillus* com características probióticas impõe uma seqüência de testes bioquímicos que visam à verificação do potencial biotecnológico das linhagens em questão.

Técnicas de biologia molecular têm sido usadas com sucesso na identificação de microrganismos nos mais variados ambientes.

Testes bioquímicos preliminares foram realizados em estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisas por Pozza (2006), onde 30 linhagens foram isoladas de fezes de crianças saudáveis da creche da Universidade Estadual de Londrina. A partir dessa análise preliminar, 08 linhagens com características probióticas foram obtidas, porém as espécies dos respectivos isolados não foram identificadas.

Diante do exposto, o presente trabalho visa identificar molecularmente através da técnica de ARDRA as 08 linhagens de interesse em função do potencial probiótico, e desenvolver um leite probiótico empregando uma dessas culturas.

### **3 OBJETIVOS**

O objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho foram:

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Identificar as espécies de linhagens de lactobacilos e avaliar os parâmetros tecnológicos da produção de um leite probiótico contendo uma espécie de *Lactobacillus* isolada de intestino humano;
  
- Analisar diferentes marcas de leites fermentados comerciais.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar pela técnica de ARDRA oito espécies de *Lactobacillus* spp. Isoladas de intestino de crianças saudáveis;
  
- Avaliar as condições de crescimento, concentração e viabilidade de um dos isolados de lactobacilos identificados para produção de um leite probiótico;
  
- Avaliar o pH, a acidez titulável, a concentração e a viabilidade dos microrganismos presentes em leites fermentados comerciais.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 O TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO

Dentro do útero, o feto se encontra estéril, mas no momento do parto, em que passa através da genitália feminina é rapidamente contaminado por bactérias da flora vaginal e fecal de sua mãe. Enquanto que no parto por cesárea eles são colonizados por bactérias do ambiente (MORAIS; JACOB, 2006). O processo de formação da microbiota gastrointestinal do recém-nascido é influenciado pela alimentação (aleitamento materno ou não) e por fatores ambientais. Na criança saudável, a microbiota está totalmente estabelecida por volta de um ano e meio a dois anos (CHEN; WALKER, 2005). Os primeiros organismos a colonizar o trato gastrointestinal após o nascimento são as bifidobactérias (MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006) e em seguida, os lactobacilos também começam a colonizar.

A microbiota gastrointestinal pode ser considerada como um órgão do corpo humano que é rapidamente renovável e metabolicamente adaptável (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999). A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (SAAD, 2006).

Vale salientar que, ao longo do trato gastrointestinal, existem grandes diferenças na quantidade e nas espécies que compõem a microbiota. O estômago é praticamente estéril (com exceção dos pacientes infectados por *Helicobacter pylori*). No início do intestino delgado encontram-se até  $10^4$  bactérias/ mL, a maior parte proveniente da orofaringe e sobreviventes ao efeito da acidez gástrica (MORAIS; JACOB, 2006).

O intestino grosso é, quantitativamente, o principal sítio de colonização bacteriana na flora intestinal humana (JOHANSSON et al., 1998) e comparando-se com outras regiões do trato gastrointestinal pode-se verificar seu extremo grau de complexidade, sendo densamente colonizado por bactérias que encontram nele condições favoráveis para sua proliferação, como ausência de secreções intestinais, grande suprimento nutricional e movimentos peristálticos bem lentos, em relação ao intestino delgado.

Existem mais de 500 diferentes espécies nativas de bactérias presentes no intestino grosso de um adulto, compreendendo por volta de 1012 bactérias por grama de peso seco (MOORE; CATO; HOLDEMAN, 1978) e cerca de 30 a 40 gêneros estão relacionados com 99% da microflora (SULLIVAN, 1996). Estas bactérias compreendem, aproximadamente, 95% do total do número de células do corpo humano e contribuem significativamente para a resistência do hospedeiro às doenças infecciosas (DUNE et al., 2001).

A microflora do intestino grosso possui várias funções no organismo, entre elas, de acordo com Macfarlane e Cummings (1999), a microflora completa a digestão através de fermentação, protege contra bactérias patogênicas e estimula o desenvolvimento do sistema imunológico.

Muitos estudos utilizam as fezes como uma ferramenta para avaliar as condições da microbiota intestinal e também a sua composição, pois de acordo com Moore, Cato e Holdeman (1978) as bactérias nas fezes refletem a flora do intestino grosso. Existem muitas bactérias que são nocivas como, por exemplo, as Enterobacteriaceae, Staphylococcus, Proteus, Veillonellae, Pseudomonas, Klebsiella, Clostridium, entre outras, e podem causar doenças. Entretanto, outras bactérias no intestino não agem prejudicialmente quando o hospedeiro está saudável, manifestando a sua patogenicidade apenas quando a resistência imunológica diminui. Essas bactérias são chamadas de “patogênicas oportunistas”, elas são mantidas em baixos níveis graças à ação inibitória de bactérias não patogênicas, principalmente Lactobacillus e Bifidobacterium.

Assim, no trato gastrointestinal existem também espécies de microrganismos que são benéficas ao seu hospedeiro, protegendo o organismo contra bactérias patogênicas, melhorando o estado inflamatório do intestino irritável (Doença de Crohn), a intolerância à lactose, a diarreia, a constipação intestinal, infecções, entre outras funções. Dentre estas espécies existem as que são consideradas probióticas, e que segundo Havenaar e Huis In't Veld (1992) são microrganismos viáveis (bactérias ácido-lácticas e outras bactérias ou leveduras empregadas na forma liofilizada ou em produtos fermentados) que exibem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro através da melhora das propriedades de sua microflora selvagem.

## 4.2 PROBIÓTICOS

A palavra probiótico de origem grega significa "para a vida" (VERNAZZA; RABIU; GIBSON, 2006), e foi empregada em 1965 por Lilly e Stilwell se referindo a fatores promotores de crescimento produzidos por microrganismos. Em 1973, Fujii e Cook definiram como compostos químicos que criam resistência à infecção no hospedeiro, mas não inibem o crescimento de microrganismos *in vitro*; um ano mais tarde, Parker (1974) utilizou o termo probiótico como organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal, ele foi o primeiro a relacionar a interação microrganismo-hospedeiro (HAMILTON-MILLER; GIBSON; BRUCK, 2003). Porém, acredita-se que quem usou a palavra probiótico pela primeira vez foi Kollath em 1953, para descrever complementos orgânicos e inorgânicos necessários para recuperar a saúde dos doentes que sofrem de uma forma de desnutrição resultante de uma dieta com alimentos altamente refinados.

No ano de 2001, Schrezenmeir e Vrese definiram probiótico como sendo “Uma preparação ou um produto contendo microrganismos viáveis em número suficiente, que alterem a microbiota por implantação, em um compartimento do hospedeiro e que exercem efeitos benéficos a sua saúde”, amplificando o termo têm-se a definição mais recente dada pelo conselho da FAO - WHO (Food and Agriculture Organization - World Health Organization, 2006): microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios sobre a saúde do hospedeiro. No Brasil, a ANVISA (2002) aceita a definição de probióticos como sendo microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

O uso de microrganismos probióticos surgiu no Oriente Médio, quando os médicos orientavam os pacientes a tomarem iogurtes e outros tipos de leites fermentados como terapêutica para afecções do trato gastrointestinal e também como estimulante do apetite.

Existem muitas evidências dos efeitos positivos dos probióticos na saúde humana e os critérios para a seleção de microrganismos probióticos devem ser baseados em aspectos de segurança, funcionais e tecnológicos (SAARELA et al., 2000). Para os aspectos de segurança é importante que o microrganismo seja de origem humana (MATTILA-SANDHOLM; MÄTTÖ; SAARELA, 1999), nos aspectos funcionais, precisam ser resistentes aos sais biliares e à acidez estomacal, bem como produzir compostos antimicrobianos, ter capacidade de modular a resposta imune e aderência aos tecidos intestinais. Por outro lado, os

aspectos tecnológicos incluem a capacidade das linhagens probióticas de resistir sob condições de produção industrial e sobreviverem na formulação final do produto (SAARELA et al., 2000).

As características essenciais para um microrganismo ser considerado probiótico são: ser um habitante normal do trato gastrointestinal do hospedeiro, sobreviver, crescer e se fixar ao epitélio intestinal, tolerar condições adversas, como a produção de sais biliares, sucos gástrico, pancreático e entérico, colonizar o intestino e ter capacidade antagônica às bactérias prejudiciais, produzindo substâncias tóxicas. Deve ser atóxico e não-patogênico para seu hospedeiro, sendo cultivável em escala industrial, tendo alta viabilidade e estabilidade no produto comercial e apresentar efeito benéfico comprovado no hospedeiro (GOLDIN, 1998).

Os probióticos são utilizados em produtos lácteos fermentados, mas também em outros alimentos, como os clínicos e em preparações farmacêuticas e eles são cada vez mais utilizados como ingredientes funcionais adicionados em alimentos não – fermentados (SALMINEN; WRIGHT, 1998). As preparações probióticas também estão amplamente disponíveis para os consumidores como pós, comprimidos e bebidas fermentadas (FOOKS; GIBSON, 2002; TEMMERMAN et al., 2003; VERNAZZA; RABIU; GIBSON, 2006; LIN et al., 2006). Além de se apresentarem também na forma de cápsulas, pastas ou sprays sendo utilizados em humanos e animais dependendo das condições de tratamento (PARVEZ et al., 2006). Estas preparações podem conter apenas uma ou várias espécies de microrganismos (FOOKS; GIBSON, 2002).

Há uma importante razão tecnológica para a utilização de produtos lácteos como carreadores de probióticos: muitos destes produtos já foram otimizados, de certo modo, para a sobrevivência dos microrganismos da fermentação. Assim, a tecnologia existente pode ser facilmente adaptada para garantir a sobrevivência suficiente das bactérias probióticas adicionadas (HELLER, 2001).

As potenciais aplicações clínicas das bactérias probióticas são muitas e refletem as preocupações dos consumidores em relação à saúde (STANTON et al., 2001). Desse modo, entre as diversas funções já descritas em estudos, como melhora do estado nutricional do hospedeiro, ação anti-câncer, inibição de bactérias patogênicas no intestino e melhora do sistema imunológico; Pelicano, Souza e Souza (2002) relataram que alguns gêneros de bactérias intestinais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune. Além disso, os probióticos são usados para tratar ou prevenir a diarreia e para melhorar os sintomas na intolerância a lactose e esta

afirmação, segundo Stanton (2001) são bem fundamentadas em evidências científicas, mas alguns dos benefícios clínicos associados aos probióticos são baseados em relatórios não comprovados e estudos mal controlados. No entanto, vale ressaltar que alguns benefícios aplicados à saúde podem ser linhagem - dependentes, enfatizando a importância da seleção da linhagem probiótica.

Os probióticos podem também ser úteis para atenuar alguns dos sintomas de alergias alimentares, tais como aqueles associados à proteína do leite (PARVEZ et al., 2006). Os probióticos mais conhecidos são as bactérias ácido-lácticas e as bifidobactérias, que são amplamente utilizadas em iogurtes e outros produtos lácteos (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999). Entretanto, outros microrganismos também podem ser utilizados, como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) e fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae*) (PARVEZ et al., 2006).

Segundo Sybesma et al., (2006) as bactérias ácido - lácticas são amplamente utilizadas como culturas starter e suas propriedades são utilizadas para fabricar produtos como queijos, iogurtes, leite fermentado, bebidas, salsichas e azeitonas. Tais bactérias também podem melhorar a segurança, a vida de prateleira, o valor nutricional, o sabor e a qualidade do produto.

Um probiótico pode ser utilizado exogenamente ou endogenamente para reforçar o estado nutricional e/ ou a saúde do hospedeiro. No caso do uso exógeno os microrganismos são mais comumente usados para fermentar diversos alimentos e este processo pode preservar e deixar os nutrientes mais biodisponíveis. Agindo exogenamente, a mais interessante propriedade que os probióticos podem ter é a produção de substâncias que podem ser antibióticas, anticarcinógenas ou que tenham outras propriedades farmacêuticas (GOLDIN; GORBACH, 1992).

Os microrganismos que mais são utilizados em produtos probióticos são os do gênero *Lactobacillus*, como por exemplo, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* e os do gênero *Bifidobacterium* como *B. bifidum*, *B. animalis* e *B. lactis*, *B. breve*, *B. infantis* e a *B. longum* (SANDERS, 1999, 2007; HOLZAPFEL et al., 2001; FOOKS; GIBSON, 2002; PARVEZ et al., 2006; MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006; GUEIMONDE; SALMINEN, 2006).

Outras espécies de microrganismos que são comumente utilizados como probióticos na indústria alimentar e agrícola são apresentados na tabela 1 e na tabela 2 estão relacionadas as espécies de bactérias ácido-lácticas mais utilizadas em preparações probióticas.

As culturas probióticas de lactobacilos têm o potencial de trazer benefícios substanciais à saúde do consumidor (GORBACH, 2000), mas a origem, o habitat e as linhagens de espécies de *Lactobacillus* têm um grande impacto sobre o seu valor como probióticos (ANNUK et al., 2003).

**Tabela 1** – Organismos utilizados como probióticos na indústria alimentar e agrícola.

Microorganismos	Comentário
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Levedura utilizada para o tratamento da diarreia.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Como um suplemento em laticínios e utilizados para fermentações; numerosas alegações de saúde.
<i>L. plantarum</i>	Em produtos lácteos, pickles e silagem.
<i>Lactobacillus GG</i>	Em iogurte e bebida de soro; várias alegações de saúde.
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Em produtos lácteos e silagem.
<i>L. brevis</i>	Em produtos lácteos e silagem.
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Para a produção de iogurte; alegações foram feitas de saúde.
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Para a produção de iogurte.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Componente de novos produtos lácteos e em preparações para recém nascido; alegações de saúde.
<i>B. infantis</i>	Similar à <i>B. bifidum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	Em determinados produtos com alegações de saúde.
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> e <i>cremoris</i>	Usado na produção de buttermilk e de certos queijos.

Fonte: Goldin e Gorbach (1992)

**Tabela 2** – Espécies de bactérias ácido-lácticas mais utilizadas em preparações probióticas.

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

Fonte: Parvez et al., 2006.

No Brasil, as espécies probióticas consideradas pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) são:

- Lactobacillus acidophilus
- Lactobacillus casei Shirota
- Lactobacillus casei variedade rhamnosus
- Lactobacillus casei variedade defensius
- Lactobacillus paracasei
- Lactococcus lactis
- Bifidobacterium animalis (incluindo a subespécie B. lactis)
- Bifidobacterium longum
- Enterococcus faecium

A quantidade mínima que se deve ingerir de microrganismos probióticos em um produto ainda é muito controversa no meio científico. Segundo a ANVISA (2008), a quantidade mínima viável deve estar situada na faixa de  $10^8$  -  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) na recomendação diária do produto pronto para o consumo para se conseguir benefícios à saúde do consumidor. Concordando com esta legislação, Gomes e Malcata (1999a) relatam que, no momento do consumo, estes produtos fermentados devem conter no mínimo  $10^6$  UFC/ mL, pois a dosagem terapêutica é considerada como sendo entre  $10^8$  -  $10^9$  células viáveis, o que é garantido através do consumo de 100g do produto contendo entre  $10^6$  -  $10^7$  UFC/ dia. Enquanto Työppönen, Petäjä e Mattila-Sandholm (2003) afirmam que a dosagem necessária para trazer benefícios seria entre  $10^9$  -  $10^{10}$  UFC/ dia.

Estes produtos devem ser consumidos regularmente para manter o efeito dos microrganismos na composição da microbiota intestinal (FARIA; BENEDET; LE GUERROUE, 2006), pois diversos estudos relatam que a flora intestinal volta a sua composição natural após o término do consumo dos probióticos.

Ao se utilizar microrganismos probióticos nos alimentos, de acordo com Heller (2001), vários fatores devem ser considerados, pois podem influenciar na capacidade dos probióticos em sobreviverem no produto e tornarem-se ativos quando entram no trato gastrointestinal do consumidor. Estes fatores incluem: o estado fisiológico dos organismos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo, temperatura), a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de

água, conteúdo de oxigênio) e possíveis interações dos probióticos (produção de bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas starters.

Entretanto, existem situações nas quais a viabilidade não é necessária para a atividade probiótica, tais como digestão da lactose, modulação da atividade do sistema imune e efeito anti-hipertensivo. Nestes casos, os efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos às células não viáveis ou seus componentes, atividades enzimáticas ou produtos da fermentação (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

As pesquisas atuais estão sendo conduzidas, tanto para avaliar os benefícios que as próprias linhagens de bactérias proporcionam como para os produtos alimentícios que estas bactérias produzem. Normalmente, os alimentos pesquisados são produtos a base de leite, incluindo leites fermentados, manteiga e leites não fermentados com culturas adicionadas.(GOLDBERG, 1994). No entanto, deve salientar-se que outros produtos fermentados (por exemplo, matérias-primas de salsichas e chucrute) podem servir como carreadores de organismos probióticos (HELLER, 2001).

#### **4.2.1 Segurança dos Probióticos**

Os probióticos são classificados pelo FDA (Food and Drug Administration) como substâncias GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja, são seguras, e a essência de seu uso tem como objetivo um equilíbrio da microflora intestinal através da adição de microrganismos benéficos (GOLDIN, 1998).

Além disso, para considerações de segurança, os novos probióticos devem ser de gêneros e linhagens comumente encontradas na microflora intestinal de humanos saudáveis (SALMINEN; WRIGHT, 1998).

O significado de origem humana ainda é debatido, mas a maioria das linhagens bem sucedidas foi retirada do trato gastrointestinal humano. Uma linhagem probiótica também pode funcionar melhor em um ambiente semelhante de onde foi, inicialmente, isolada. Assim, os aspectos de segurança incluem: linhagens para uso humano, sendo preferencialmente de origem humana saudável; ter um histórico de ser não-patogênico e nenhuma associação com doenças como a endocardite infecciosa ou distúrbios gastrointestinais e não carregar genes transmissíveis de resistência aos antibióticos (SAARELA et al., 2000).

A probabilidade de qualquer microrganismo isolado de alimento ou de intestino sadio causar uma infecção no hospedeiro é relativamente pequena. A maioria dos microrganismos intestinais não é patogênica em indivíduos saudáveis, mas vários microrganismos viáveis que são capazes de crescer em certas condições encontradas em um hospedeiro podem causar uma infecção em certas circunstâncias, por exemplo, em indivíduos severamente imunodeprimidos (SALMINEN et al., 1999).

Os dados disponíveis não indicam nenhum risco significativo à saúde pelas bactérias ácido-lácticas ingeridas. As infecções clínicas em seres humanos são extremamente raras (com exceção das causadas por enterococos) (ADAMS, 1999).

Bactérias ácido-lácticas têm sido, há muito tempo, usadas para aumentar a segurança dos alimentos através da fermentação. São consideradas probióticas, principalmente, as espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A maioria dos membros desses gêneros não é considerada agente patogênico ou mesmo agente patogênico oportunista.

No entanto, raros casos de infecção por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram relatados, possivelmente, associados com o consumo de produtos probióticos. Esses casos são extremamente raros e os indivíduos sempre tiveram graves condições subjacentes. Não foram encontrados na literatura, relatos de qualquer risco para a população em geral (GUEIMONDE RAFAEL; OUWEHAND, 2006).

De acordo com a citação acima, Gomes e Malcata (1999b) relatam que em qualquer um dos dois gêneros, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, as espécies correntemente utilizadas ao nível tecnológico são não-patogênicas, gozando do status GRAS. Assim como o gênero *Lactococcus* (SALMINEN et al., 1998).

Estudos clínicos controlados e testes de toxicidade com lactobacilos e bifidobactérias não revelaram efeitos prejudiciais causados por esses microrganismos (SAAD, 2006; SALMINEN et al., 1998). No entanto, apesar dos *Lactobacillus* spp. serem classificados como microrganismos GRAS, devido à sua longa e segura utilização como fermentos de produtos fermentados, é importante avaliar a segurança desses microrganismos destinados a serem utilizados como aditivos alimentares (PINTO et al., 2006).

Comparado com muitos agentes farmacêuticos, os probióticos são extremamente seguros e bem tolerados, e graves efeitos adversos raramente ocorrem (REID, 2006). Saxelin et al.(1996) estudaram a prevalência de bacteremia entre 1989 e 1992, no sul da Finlândia. Entre os 3317 isolados de hemocultura, os lactobacilos foram identificados em oito pacientes, cinco dos quais tinham uma doença grave predisponente para complicações de

bacteremia. Mas os resultados não forneceram provas de que uma determinada espécie ou subespécie de *Lactobacillus* tenha sido a causa das infecções. Os dados mostram uma associação não freqüente de lactobacilos com infecções causadas por bactérias, apesar da presença destes organismos no trato gastrointestinal e o seu consumo generalizado nos leites fermentados; assim, há fortes indícios de que seu potencial patogênico é muito baixo.

Entretanto, sempre existe a possibilidade de que o consumo de probiótico pode causar infecções e que as pessoas vão reagir de maneiras diferentes a uma linhagem específica. A indústria alimentar precisará avaliar, cuidadosamente, a segurança e a eficácia de todas as espécies e linhagens novas de probióticos antes de incorporá-las em produtos alimentares (PARVEZ et al., 2006).

#### **4.2.2 Morfologia e Fisiologia dos Lactobacilos**

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e a família Lactobacillaceae.

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez das fezes de crianças amamentadas no seio materno, em 1900 por Ernst Moro, um pediatra austríaco.

Os lactobacilos são geralmente caracterizados como bactérias Gram-positivas, incapazes de formar esporos, desprovidas de flagelos, possuindo forma de bastonetes ou de bastonetes curtos, e são aerotolerantes, microaerófilas ou anaeróbias (GOMES; MALCATA, 1999b; BERNARDEAU; GUGUEN; VERNOUX, 2006). Estes microrganismos também são catalase - negativos, não possuem citocromos, não reduzem nitrato e fermentam a lactose e outros açúcares simples convertendo-os a ácido láctico. Possuem maior tolerância ao ácido do que qualquer outro gênero de bactérias ácido - lácticas, que é uma propriedade muito importante na fase final de alimentos fermentados, enquanto outros microrganismos são inibidos pelo baixo pH.

### 4.2.3 Resistência ao Trato Gastrointestinal

Após a ingestão oral, as bactérias encontram uma série de obstáculos de defesa do corpo humano e substâncias que são produzidas para auxiliar no processo digestivo dos alimentos e que podem ser nocivas a elas.

Segundo Hamilton, Shah e Winkler (1999) os probióticos, conhecidos como microrganismos viáveis adicionados aos alimentos, são normalmente administrados oralmente, principalmente em produtos lácteos. Desta forma, é importante sua sobrevivência durante o trânsito através do trato gastrointestinal, o que implica na habilidade destes microrganismos em sobreviverem à acidez do estômago e à bile, para que possam exercer seus benefícios no hospedeiro (COLLINS; THORNTON; O'SULLIVAN, 1998).

As bactérias probióticas devem ser capazes de resistir a um baixo pH e sobreviver à acidez gástrica, tolerar concentrações de sais biliares presentes no intestino, além de possuírem capacidade de adesão às células da mucosa intestinal, proporcionando desta forma os benefícios clínicos (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999; GUEIMONDE, M.; SALMINEN, 2006).

Devido ao fato das bactérias ingeridas com um alimento, passarem por todo trato gastrointestinal humano e serem expostas a sucessivos fatores estressantes que influenciarão a sua sobrevivência, existe a necessidade de se realizar testes in vitro que simulem esta passagem a fim de se selecionar linhagens que apresentem características probióticas.

Estudos revelam que por volta de 10 a 30% dos probióticos sobrevivem à passagem pelo organismo, mas isso depende muito da espécie.

Linhagens probióticas devem ser resistentes ao ácido gástrico e aos sais biliares, e podem persistir no estômago por um período superior a outras bactérias (FOOKS; GIBSON, 2002).

#### 4.2.3.1 Sais biliares

A bile é sintetizada continuamente pelo fígado e é armazenada e concentrada na vesícula biliar; composta por eletrólitos, sais biliares (50% dos sólidos,

sintetizados a partir do colesterol), pigmentos biliares, lecitina, colesterol, ácidos graxos e proteínas plasmáticas. É liberada, após uma refeição, no duodeno e possui uma função detergente, emulsificando os lipídeos (ERKKILA; PETAJA, 2000). Assim, de acordo com Gilliland e Speck, (1987) a sobrevivência das bactérias é reduzida pela destruição de sua membrana celular, cujos principais componentes são os lipídeos e ácidos graxos.

O intestino delgado e o cólon contêm altas concentrações de ácidos biliares, os quais podem inibir o crescimento ou matar muitas bactérias. Portanto, é essencial que probióticos, para serem eficazes, devem ser capazes de crescer em 0,15 - 0,30% de Oxgall (GOLDIN; GORBACH, 1992).

Os ácidos biliares sofrem modificações químicas no cólon, resultante da atividade microbiana, e algumas destas modificações podem produzir substâncias antibacterianas contra microrganismos patogênicos.

#### **4.2.3.2 Fenol**

Além dos sais biliares, existe no intestino a presença de compostos tóxicos como, por exemplo, o fenol. Este composto é produzido pela microbiota intestinal, pois como esta é composta por diferentes espécies bacterianas, há a conversão de várias substâncias em produtos tanto benéficos como nocivos ao hospedeiro (MITSUOKA, 1996).

O fenol pode exercer um efeito bacteriostático contra algumas linhagens de *Lactobacillus* (PINTO et al., 2006).

Bactérias intestinais como as enterobactérias, peptostreptococos, clostrídios e eubactérias produzem urease, que hidrolisa a uréia em substâncias potencialmente tóxicas como amônia, fenóis, aminas farmacologicamente ativas e indol, que normalmente são detoxificadas no fígado antes da excreção nas fezes e urina (RASIC; KURMANN, 1983).

Desta maneira, é importante que as linhagens possivelmente probióticas sejam testadas também quanto a sua resistência ao fenol.

### 4.2.3.3 Acidez

Nos indivíduos em jejum, o pH do estômago está entre 1,0 e 2,0 e a maioria dos microrganismos, incluindo lactobacilos, pode sobreviver somente entre 30 segundos e alguns minutos sob estas condições (CONWAY; GORBACH; GOLDIN, 1987).

O pH do ácido clorídrico secretado no estômago é 0,9, e em presença de alimento aumenta para 3,0 (ERKKILA; PETAJA, 2000). Portanto, para que um probiótico seja eficaz, mesmo a seleção da linhagem que pode sobreviver em pH 3,0 por algum tempo, terá de ser introduzida em um sistema tampão, como leite, iogurte ou alimento (GOLDIN; GORBACH, 1992).

O suco gástrico apresenta uma barreira enzimática e de pH que é letal à maioria dos microrganismos ingeridos durante a digestão (MARTINS et al., 2005). Assim, um dos mais importantes critérios para a seleção de uma linhagem probiótica é a sua tolerância ao ácido gástrico (CEBECI; GÜRAKAN, 2003), sendo considerado que a habilidade de uma bactéria probiótica sobreviver à passagem através do estômago é variável e linhagem (e até mesmo isolado)-dependente (CHARTERIS; KELLY; MORELLI, 1998; CEBECI; GÜRAKAN, 2003).

Os resultados de Dunne et al. (2001) que analisaram a resistência, *in vitro*, de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* à passagem pelo trato gastrointestinal humano sugerem que os isolados de *Lactobacillus* poderiam transitar com sucesso no estômago humano e serem capazes de atingir o intestino de forma viável. As bifidobactérias, no entanto, revelaram ser menos resistente ao ácido quando expostas ao suco gástrico humano.

### 4.2.4 Resistência a Antimicrobianos

A resistência aos antibióticos é um problema clínico e sócio-econômico que veio para ficar (NORMARK; NORMARK, 2002).

A elevada suscetibilidade e resistência intrínseca de linhagens de *Lactobacillus* a uma série de antibióticos são importantes. Linhagens que demonstram resistência a um determinado antibiótico podem ser administradas juntamente ao tratamento antibiótico. No tratamento de infecções do trato urogenital e diarreia do viajante, é obtido um

melhor efeito quando a terapêutica for feita com lactobacilos probióticos e antibióticos aos quais estão intrinsecamente resistentes. Ao fazê-lo, a microflora intestinal pode se recuperar mais rapidamente (CEBECI; GÜRAKAN, 2003). Os mesmos autores ainda comentam que uma importante desvantagem da resistência aos antibióticos é que a transferência de genes de resistência antibiótica é possível.

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca da linhagem ou adquirida por transferência de genes resistentes oriundos de outro microrganismo, o que é mais freqüente de se ocorrer (SAARELA et al., 2000).

A maior parte das resistências aos antibióticos de *Lactobacillus* spp. parece ser intrínseca (AMMOR; FLÓREZ; MAYO, 2007).

Resistência intrínseca significa que cada membro de toda uma espécie bacteriana é resistente, sem qualquer alteração genética adicional e a resistência adquirida aos antibióticos ocorre tanto por mutações (mutações de ponto, deleções, inversões, inserções, etc., dentro do genoma bacteriano) como por transferência horizontal de genes.

A transferência horizontal gênica é a troca de material genético entre linhagens ou até mesmo espécies remotamente relacionadas (BROWN, 2003), ocorrendo em bactérias através da conjugação, transdução e transformação. Esta transferência pode ser perigosa se certos genes de resistência a antibiótico, presentes em microrganismos, como por exemplo, um lactobacilo, forem transmitidos a bactérias patogênicas, no ambiente intestinal.

Há uma série de diferentes elementos de DNA descritos transferindo a resistência aos antibióticos: ilhas de resistência (tipo de ilha genômica, onde os mesmos genes em distintos organismos que apresentam a mesma função em diferentes contextos ecológicos), profagos (DNA viral integrado ao genoma de bactérias), transposons (cadeias de DNA com seqüências de inserção em suas terminações), íntegrans (elementos móveis de DNA com a habilidade de capturar genes, podem fazer uma recombinação em locais específicos do DNA) e os plasmídeos (NORMARK; NORMARK, 2002).

Os plasmídeos são moléculas duplas circulares de DNA que estão separadas do DNA cromossômico, sendo geralmente os carreadores destes genes de resistência. Os plasmídeos portadores de genes que conferem resistência a antibióticos são chamados plasmídeos R (RResistência).

Eles possuem também, genes que permitem sua passagem de uma bactéria para outra (RTF ou Fator de Transferência de Resistência).

Assim, devido às graves preocupações sobre o crescente nível de resistência aos antibióticos em uso regular na medicina humana, um dos aspectos que necessita ser

analisado é a resistência aos antibióticos (PINTO et al., 2006) e é muito importante determinar se os genes de resistência do microrganismo aos antibióticos estão presentes nos cromossomos ou nos plasmídeos.

É possível fazer testes *in vitro* para verificar se há transferência dos genes de resistência entre espécies bacterianas.

Apesar de muitas linhagens de bactérias lácticas, particularmente as de *Lactobacillus* spp., serem resistentes a determinados antibióticos, essa resistência normalmente não é mediada por plasmídeos, não sendo transmissível, mas representa uma característica específica intrínseca da espécie ou gênero do organismo. Estes casos não são susceptíveis de constituir qualquer preocupação de segurança (SALMINEN, et al., 1998; SAARELA et al., 2000). Entretanto, há descrição de linhagens portadoras de plasmídeos de resistência, particularmente de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (SAAD, 2006). Enquanto que linhagens de *L. casei* e *L. rhamnosus* também possuem resistência a vancomicina, mas intrinsecamente, sendo consideradas seguras, não havendo indícios de transferência de resistência para outras bactérias (TYNKKYNEN; SINGH; VARMANEN, 1998).

Pozza (2006) testou linhagens de *Lactobacillus* spp. retirados de intestino humano quanto à resistência a antibióticos utilizados na terapia humana (penicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e estreptomicina) e verificou que todas as linhagens foram resistentes a estreptomicina. Mas não se determinou se esta característica era intrínseca ou adquirida.

#### **4.2.5 Produção de substâncias antimicrobianas**

Os metabólitos antimicrobianos podem ser divididos em compostos de baixa massa molecular (abaixo de 1000 Da) e bacteriocinas (massa molecular superior a 1000 Da) (NIKUPAAVOLA et al., 1999).

Certas bactérias consideradas como probióticos também podem produzir bacteriocinas, que são proteínas metabolicamente ativas ou peptídeos, que são tóxicas a microrganismos indesejáveis (BERNARDEAU; GUGUEN; VERNOUX, 2006). E se a cultura selecionada produz bacteriocinas, deveria ter maior chance de crescer e estabelecer no intestino (GILLILAND, 1989).

Muitas bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são muito potentes, têm um largo espectro inibitório e podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos em diversas aplicações práticas. Essas bacteriocinas têm atraído grande interesse devido ao seu potencial uso como aditivo não-tóxico e seguro para a alimentação e preservação de alimentos (HOLO et al., 2001).

Mais de 70 tipos diferentes de bacteriocinas foram identificadas como sendo produzida por bactérias ácido - lácticas (TAMIME, 2002), entre elas uma substância de baixo peso molecular, a reuterina, produzida pelo *L. reuteri*. Tanto os lactobacilos como as bifidobactérias são capazes de produzir esses elementos. Outro fato de interesse é que o *Lactobacillus rhamnosus* GG, além da produção de bacteriocinas, produz também um biosurfactante, que auxilia na sua própria sobrevivência (MORAIS; JACOB, 2006).

As bacteriocinas têm atividade bactericida, não sendo letal para as bactérias que as produzem (PELICANO; SOUZA; SOUZA, 2002).

O *L. plantarum* é a espécie mais freqüentemente associada com a produção de bacteriocinas. Uma série de bacteriocinas tem sido isolada de diferentes linhagens de *L. plantarum* (FOOKS; GIBSON, 2002). A plantaricina W, uma nova bacteriocina descoberta de uma linhagem de *L. plantarum* que foi isolada de vinho, mostrou-se inibitória para muitas bactérias Gram-positivas, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, entre outras, mas não para Gram-negativas (HOLO et al., 2001).

Outros exemplos de bacteriocinas são: caseicina de *L. casei*, lactacina, acidofilina, acidofilicina, acidocina e acidolina de *L. acidophilus*, gassericina de *L. gasseri* e reuteriiclina e reutericina de *L. reuteri* (TAMIME, 2002).

#### **4.3 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO**

A seleção dos microrganismos que podem ajudar, terapeuticamente e nutricionalmente, deve ser baseada nas propriedades específicas desejadas. Isso pode ser alcançado ou por técnicas de seleção biológica clássica ou por engenharia genética (GOLDIN; GORBACH, 1992).

Devido ao crescente interesse na utilização de bactérias como probióticos ou starters em produtos lácteos, a identificação das espécies destes microrganismos é cada vez mais necessária (MOREIRA et al., 2005).

A detecção, diferenciação e identificação dos microrganismos podem ser realizadas por inúmeros métodos incluindo: fenotípicos, bioquímicos e testes imunológicos, e hoje em dia, as técnicas moleculares são as mais aplicadas. A identificação de microrganismos, quando exclusivamente baseada em características fisiológicas e bioquímicas, é intrinsecamente ambígua. Neste momento, a caracterização fenotípica representa o método padrão para a maioria das identificações de bactérias, mas é considerada a mais tediosa tarefa durante o processo de reconhecimento de espécies microbianas, uma vez que requer uma quantidade significativa de tempo para a preparação, habilidade no laboratório, além de padronização da técnica para uma interpretação objetiva dos resultados para evitar observações subjetivas (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

As características bioquímicas rastreadas por testes convencionais podem ser insuficientes para permitir a discriminação das espécies (NOUR, 1998). E de acordo com Moreira et al. (2005), em geral, cerca de 17 testes fenotípicos são necessários para se identificar a espécie de um isolado de *Lactobacillus*, o que é praticamente inviável quando se tem um número muito grande de microrganismos para se identificar. Assim, o estabelecimento de um método de identificação simples e rápido é necessário, a fim de ser capaz de lidar com o grande número de *Lactobacillus* isolados, que podem ser obtidos durante estudos ecológicos microbianos de ecossistemas, tais como o trato intestinal humano ou animal e de produtos alimentares.

Devido ao fato de que, freqüentemente, os lactobacilos isolados do trato gastrointestinal não apresentam caracteres fisiológicos e bioquímicos em conformidade com a classificação taxonômica, para se caracterizar linhagens de lactobacilos de tal origem tornam-se necessárias outras técnicas (KHALED et al., 1997), como as técnicas moleculares.

Assim, segundo Oneca et al. (2003) as técnicas moleculares oferecem vantagens em relação a técnicas convencionais de classificação, principalmente devido ao poder de discriminação, a habilidade para classificar linhagens e a produção de dados adequados para análises estatísticas.

Métodos moleculares (genotípicos) são úteis para identificar bactérias, quer como complemento ou alternativa aos métodos fenotípicos, além de aumentar a sensibilidade e a especificidade do processo de detecção, eles reduzem muito a subjetividade inerente à

interpretação morfológica e dados biológicos. Basicamente, o DNA é invariável ao longo de todo o ciclo de vida microbiana (SETTANNI; CORSETTI, 2007).

Atualmente, um grande número de técnicas moleculares está disponível para a identificação de bactérias ácido-lácticas, para processos industriais e produtos alimentares. Para cada tipo específico de investigação ou análise, uma boa escolha tem de ser feita no que diz respeito à metodologia a ser aplicada em relação à resolução taxonômica, considerando trabalho e custos (RIVAS; MARCOBAL; MUNÓZ, 2006).

A classificação e identificação de probióticos são baseadas na comparação de moléculas altamente conservadas, ou seja, genes que codificam RNA ribossomal (rRNA). Grandes avanços nos métodos de biologia molecular têm permitido o seqüenciamento de seqüências 16S/23S rRNA e, conseqüentemente a geração de grande seqüência de bases de dados, o que pode facilitar uma classificação rápida e precisa de uma linhagem pretendida de probiótico (HOLZAPFEL et al., 2001; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O seqüenciamento de DNA de genes conservados amplificados por PCR, tais como os de rRNA é o método mais utilizado para a tipagem de microrganismos. Por isso, genes que codificam RNA ribossomal (rDNA), compreendendo domínios conservados e variáveis, são escolhidos para estudos filogenéticos (HOLZAPFEL et al., 2001). No entanto, ele exige equipamentos especiais e lidar com centenas de diferentes isolados torna-se muito caro (MOREIRA et al., 2005).

No entanto, outras técnicas moleculares podem ser utilizadas para a identificação de bactérias ácido-lácticas como: hibridização DNA-DNA, PCR-Multiplex, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), amplificação dos genes 16S e 23S, entre outras. Mas Barry et al. (1991) demonstraram que as regiões intergênicas ribossômicas são mais variáveis entre espécies bacterianas, em comparação com os genes 16S e 23S rRNA. Assim, a análise do número e tamanho das regiões intergênicas entre os genes 16S e 23S mostrou que eles variam entre *Lactobacillus* e outras bactérias permitindo a discriminação de gêneros. Um grande número de espécies de *Lactobacillus* pode ser identificado, eficazmente, com base nos padrões de restrição das suas regiões intergênicas 16S-23S (MOREIRA et al., 2005).

A utilização de seqüências de RNA ribossômico ou os genes que codificam o rRNA (rDNA) tem sido muito significativas para as identificações de lactobacilos, assim a técnica de ARDRA (Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis) foi escolhida para ser utilizada neste trabalho por diversas razões como, por exemplo, ser uma análise rápida da diversidade e com elevada afinidade genética.

### 4.3.1 ARDRA

Diversos métodos de biologia molecular são, recentemente, utilizados para a identificação de bactérias, incluindo a metodologia de ARDRA, que consiste em submeter um fragmento de DNA à técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) seguida, por uma hidrólise dos produtos por meio de enzimas de restrição. Segundo Reis Junior, Teixeira e Reis (2004) as enzimas de restrição devem ser selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do RNAr que reflete padrões filogenéticos; pois esta técnica utiliza-se das características do RNA ribossômico.

A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética (GRIFONI et al., 1995), além de ser um método que constitui um modo específico e reprodutível para se identificar a espécie de bactérias ácido-lácticas (MOREIRA et al., 2005) e no caso da análise de microdiversidade, que apresenta grupo de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S – 23S DNAr (REIS JUNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2004). Esta região apresenta maior variabilidade na composição de bases e também em seu tamanho, quando comparada às regiões gênicas 16S e 23S, isoladamente.

Além disso, a maioria dos gêneros de bactérias co-isolados com *Lactobacillus* pode ser identificada com precisão através da PCR-ARDRA com região espaçadora 16S-23S (MOREIRA et al., 2005).

Muitos trabalhos utilizam a técnica de ARDRA para a identificação de linhagens probióticas de alimentos, animais ou do trato gastrointestinal. Entre eles, Scolari et al. (2002) utilizaram esta técnica para identificar linhagens de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* isoladas de vários habitats (produtos lácteos, vegetais, vinho e conteúdo intestinal) e confirmar a posição taxonômica das linhagens. Mota et al. (2006) isolaram lactobacilos de diferentes regiões do trato gastrointestinal de frangos utilizando a técnica de ARDRA para selecionar linhagens com algumas propriedades probióticas. E Roy, Sirois e Vincent (2001) que discriminaram molecularmente lactobacilos utilizados como cultura starters ou probióticas.

#### 4.3.1.1 PCR

Em 1993, o geneticista Kary Mullis, recebeu o prêmio Nobel da Química, pelo desenvolvimento de um método que permite sintetizar em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA.

Na técnica de PCR, fragmentos, pequenos e específicos, do genoma de um microrganismo podem ser amplificados utilizando-se seqüências iniciadoras chamadas de primers, estes são complementares a seqüências de regiões específicas do genoma. Após a desnaturação da dupla - hélice do DNA, ocorre, a partir dos primers, a extensão das novas fitas pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a Taq DNA polimerase, isolada originalmente da bactéria hipertermofílica *Thermus aquaticus* e encontrada em fontes termais do parque florestal de Yellowstone - USA. Cada uma das novas fitas de DNA extendidas a partir dos primers serve como template para síntese de uma nova fita. Isso garante o aumento exponencial do número de novas fitas. Mas para que ocorra esta extensão é necessária também a presença de deoxinucleosídeos trifosfatados de adenina, timina, citosina e guanina que vão compor a nova fita de DNA e o co-fator  $Mg^{2+}$ . Um ciclo de 3 temperaturas é repetido 30 ou mais vezes e assim, ocorre uma amplificação exponencial, resultando em mais de 1 milhão de cópias do fragmento inicial de DNA. Com 30 ciclos, por exemplo, consegue-se 1,073,741,824 de cópias do fragmento de DNA que está sendo analisado.

Grande parte das atuais técnicas moleculares utiliza a PCR ou variações dela para o estudo da diversidade de bactérias (REIS JUNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2004).

#### 4.3.1.2 Enzimas de Restrição

A descoberta das enzimas de restrição ou endonucleases de restrição ocorreu no início dos anos 70 do século XX, sendo que mais de 1000 enzimas já foram identificadas.

As enzimas de restrição reconhecem uma seqüência específica de bases nitrogenadas na dupla fita de DNA, geralmente seqüências de 4 a 8 pares de bases, chamados palíndromos, e as cortam, em lugares determinados. Estas enzimas são indispensáveis no seqüenciamento e na clonagem de moléculas de DNA, nas análises da estrutura dos

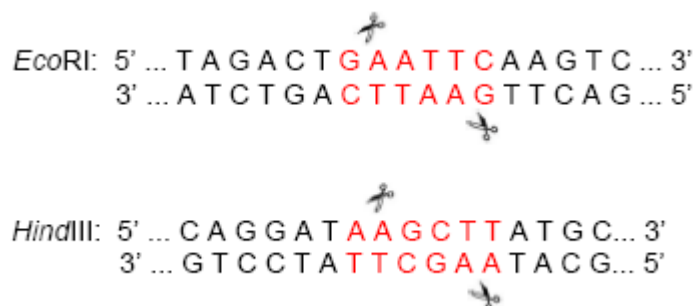
cromossomos e no isolamento de genes, possibilitando testes como de paternidade e criminalística, a criação plantas transgênicas, vacinas, reagentes de diagnóstico, etc.

Estas endonucleases de restrição são obtidas de bactérias, estando o nome da enzima relacionado com o organismo de onde esta foi isolada. A primeira letra representa o gênero e as outras duas letras à espécie, seguido de um algarismo romano (ou outra letra) que indica a ordem da descoberta ou a linhagem da qual a enzima foi isolada; por exemplo, a enzima EcoRI vem de uma *Escherichia coli* que carrega um fator de transferência de resistência RI, enquanto que a HindIII é isolada da *Haemophilus influenza*, linhagem d III.

A descoberta destas enzimas revolucionou a biologia molecular e a engenharia genética, possibilitando a criação de moléculas de DNA recombinante.

Segundo Garcia (1995), são as enzimas que hidrolisam (quebram ou cortam) uma molécula de DNA em uma região específica. Estas enzimas podem ser utilizadas como suporte para a biotecnologia, pois "quebram" o DNA, fornecendo fragmentos de genes que poderão ser utilizados em processos para clonagem, hibridização, "finger-printing", identificação de genes e outras manipulações genéticas.

Há uma variedade dessas enzimas que se diferenciam pela sua especificidade em fragmentar o DNA em pedaços, conforme as seqüências de bases nitrogenadas reconhecidas (NAOUM, 2000), como no exemplo da enzima EcoRI que cliva o DNA quando encontra uma seqüência palindrômica, isto é, que tem um eixo de simetria, onde a seqüência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida na direção inversa: G-A-A-T-T-C (guanina-adenina-adenina-timina-timina-citosina) e a enzima HindIII clivando o DNA na seqüência A-A-G-C-T-T (Figura 1).



**Figura 1** – Sítios de clivagem do DNA pelas enzimas EcoRI e HindIII.

Johansson et al. (1993) encontram em seu estudo isolados de lactobacilos que se mostraram fenotipicamente idênticos. No entanto, estes microrganismos diferiam

geneticamente. Isso demonstra a necessidade da utilização de métodos de identificação genética em estudos de colonização intestinal, onde é preciso a identificação das linhagens.

Além disso, nos últimos anos, aumentou o interesse comercial na exploração de novas linhagens e produtos e também dos atributos de saúde atribuídos aos probióticos, o que tem contribuído de forma significativa para o rápido crescimento e expansão deste setor no mercado (MATTILA-SANDHOLM; MÄTTÖ; SAARELA, 1999; STANTON et al., 2001).

Desta maneira, o mercado se encontra aberto para receber novas linhagens de lactobacilos probióticos, como a que está sendo proposta neste estudo.

#### **4.4 PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO**

A indústria láctea é afortunada de ter um alimento naturalmente saudável, o leite, que pode ser convertido facilmente e com custo relativamente barato em produtos com qualidade nutritiva superior (SELLARS, 1981).

O leite e produtos lácteos têm um elevado valor nutricional e são componentes importantes da dieta humana, em praticamente todas as partes do mundo (KIM; GILLILAND, 1983). Ele é considerado o alimento mais perfeito da natureza. Apresenta uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio) sendo fonte essencial à saúde do homem.

A fermentação é um método de preservação largamente utilizado desde os primórdios da civilização, pela ausência de métodos de refrigeração ou pasteurização (FARIA; BENEDET; LE GUERROUE, 2006). O processo de fermentação consistia na coagulação por microrganismos presentes no leite.

O leite fermentado surgiu no Oriente Médio, mais precisamente, na Mesopotâmia (atual Iraque) por volta de 5000 a.C., mas esta data ainda é muito questionada. Evidências arqueológicas de certas civilizações (Sumérios, Babilônios, Faros e Índios) sugerem que estas estavam bastante avançadas na agricultura e na produção de leites fermentados (TAMIME, 2002).

De acordo com Brasil (2000), entende-se por leites fermentados os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácteos próprios (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus*

salivarius subsp thermophilus e/ ou outras bactérias ácido-lácticas que por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final). Estes devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade.

O consumo do leite fermentado vem aumentando ano a ano, o que incentiva a melhoria da tecnologia e da qualidade desse produto. Até pouco tempo atrás, o iogurte tradicionalmente produzido com fermentos compostos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp.bulgaricus e *Streptococcus salivarius* ssp. thermophilus era a base do consumo de leites fermentados, mas esta realidade está mudando e os consumidores, incluindo os brasileiros, estão aumentando o consumo de outros tipos de leite fermentado que surgem continuamente.

Segundo Marshall e Tamime (1997) o mercado de leites fermentados está expandindo tanto quanto os consumidores se tornam mais interessados nos possíveis aspectos saudáveis do produto.

Produtos obtidos pela fermentação do leite são fontes palatáveis e econômicas de uma ampla gama de nutrientes. A composição nutricional é semelhante à do leite, mas as concentrações de vitaminas são, em geral, um pouco mais baixas, com a possível exceção do ácido fólico. As concentrações de ácido láctico, galactose, aminoácidos livres e ácidos graxos, são aumentadas como resultado da fermentação (GURR, 1987).

Considera-se que alguns leites fermentados apresentam propriedades terapêuticas por serem elaborados com bactérias que incluem lactobacilos, bifidobactérias e estreptococos, cuja origem geralmente é o trato gastrointestinal humano e apresentam, além dos efeitos bioquímicos e biológicos sobre os nutrientes do leite, efeitos fisiológicos e terapêuticos sobre o consumidor (FARIA; BENEDET; LE GUERROUE, 2006).

#### **4.4.1 Espécies Empregadas**

As espécies mais frequentemente empregadas na produção de produtos lácteos probióticos são de origem intestinal humana, pois geralmente são mais adequadas às necessidades fisiológicas do hospedeiro e podem mais facilmente colonizar seu intestino do que linhagens selvagens ou provenientes do cólon de outros animais (GOMES; MALCATA, 1999a). Assim, é importante que as bactérias empregadas no produto sejam hospedeiroespecíficas para que a sua eficácia seja a máxima atingida.

As bactérias ácido-lácticas que, geralmente, são utilizadas para a produção de leites fermentados são assim chamadas por fermentarem açúcares simples, presentes no leite ou adicionados no momento do preparo, produzindo o ácido láctico como seu principal produto de metabolismo.

Linhagens de *Lactobacillus* spp. ocorrem naturalmente no intestino humano e, por esse motivo, essas linhagens intestinais são, também, preferencialmente, desenvolvidas para fins de utilização comercial como probióticos (PINTO et al., 2006), assim como as espécies de *Bifidobacterium* spp.

Desta maneira, os gêneros de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais comumente utilizados na fabricação de leites fermentados, e entre as espécies podemos citar: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* e *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricu*, e *L. rhamnosus*. Outros gêneros como, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Propionibacterium* também podem ser utilizados para fermentar o leite.

#### **4.4.2 Controle de qualidade**

Na atualidade, a questão da qualidade dos alimentos, tem recebido maior atenção por parte das autoridades, indústria, profissionais envolvidos, produtores e consumidores de modo geral.

A qualidade do leite fermentado é avaliada sob diversos aspectos que se podem resumir nos seguintes: qualidade físico - química, onde se avaliam o tempo de fermentação (tempo que o inóculo leva para atingir a fermentação desejada), o pH (onde a determinação de seus valores fundamenta-se na medida da concentração dos íons hidrogênio na amostra) e a acidez titulável (determinada por titulação e expressa em porcentagem de ácido láctico), e ainda a qualidade higiênica do leite, através de análise microbiológica (para se verificar o padrão higiênico da bebida).

A ANVISA, através da Resolução - RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001, estabeleceu padrões microbiológicos para diversos alimentos. Os limites de tolerância adotados para um leite fermentado estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3** – Limites de tolerância para padrões microbiológicos para um leite fermentado.

GRUPO DE ALIMENTO	MICROORGANISMO	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA INDICATIVA	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA REPRESENTATIVA			
			n	c	m	M
Leite Fermentado, com ou sem adições, refrigerado, e com bactérias lácticas viáveis nos números mínimos.	Coliformes a 45°C/g	10	5	2		10

Fonte: ANVISA, 2001.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, ambos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

### **5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS**

Os isolados foram obtidos por Pozza (2006) de fezes de seis crianças saudáveis, de ambos os sexos, de até um ano de idade da creche da Universidade Estadual de Londrina.

Para se verificar o potencial biotecnológico dos 30 isolados, Pozza (2006) os testou quanto à sua resistência aos sais biliares, tolerância a condições ácidas e ao fenol, o que simula a passagem através do trato gastrointestinal humano. Oito destes isolados apresentaram potencial de uso como probiótico, em função do comportamento apresentado sob as condições aplicadas.

### **5.2 EXTRAÇÃO DO DNA**

Pozza (2006) extraiu o DNA dos isolados, L4, L5, L12, L19, L20, L22, L23 e L24, de *Lactobacillus* spp. de acordo com a metodologia de Luchansky, Tennant e Klaenhammer (1991) modificada, pois são estes os isolados que possuem as propriedades desejáveis para sobreviverem às condições do trato gastrointestinal e se caracterizam como potenciais para serem usados como probiótico.

### 5.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S - 23S POR PCR

A partir do DNA obtido das oito linhagens, foi realizada a eluição destes DNAs utilizando o S.N.A.P. – Gel Purification Kit (Invitrogen) e, em seguida, a amplificação da região espaçadora 16S - 23S do DNA ribossomal por PCR utilizando os iniciadores descritos por Tilsala-Timisjarvi e Alatosava (1997): 16-1A, 5'-GTCGGAATCGCTAGTAATCG-3' e 23-1B, 5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3'. As reações de PCR foram realizadas em tubos de PCR de 0,2mL nas seguintes condições: reações de 10 $\mu$ l contendo 10mM de dNTP, 10mM Tris HCl e 50mM KCl pH 8,3; 1 U de Taq DNA polimerase, 20pmol/ $\mu$ l de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, água destilada estéril e 25ng de DNA como mostrado na tabela 4. Todas as preparações foram realizadas em câmara asséptica.

**Tabela 4** – Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de PCR.

Reagentes	Volume ( $\mu$ L)
Primer 1	1,0
Primer 2	1,0
MgCl <sub>2</sub>	0,3
dNTP	1,0
Tampão	1,0
TAq polimerase	0,2
Água estéril	4,5
Total	9 + 1,0 $\mu$ L DNA

As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura em termociclador (Biometra - T1 Thermocycler): 95°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão) e cada ciclo foi repetido 30 vezes. O programa também incluiu uma pré-incubação a 92°C por 2 minutos antes do primeiro ciclo e uma incubação a 72°C por 10 minutos, seguido por um esfriamento a 5°C por 5 minutos após o último ciclo.

Na amplificação foi incluído também um controle negativo, que consistia em um tubo de PCR de 0,2mL contendo todos os componentes da reação, ao qual não se adicionava o DNA, isto para se verificar uma possível contaminação.

Para se comprovar a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão de corrida TEB1X (pH 8,0) e voltagem constante de 90V por 40 minutos. Em cada compartimento do gel foi adicionado uma mistura de 5qL da amostra de DNA amplificado e 2qL de tampão de corrida simples. O gel foi corado com brometo de etídio 20mg/ml e visualizado em transiluminador de UV (Transiluminator – Loccus Biotecnologia).

Após esta etapa, os produtos amplificados foram submetidos à hidrólise com enzimas de restrição.

### 5.3.1 Enzimas

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à hidrólise com as seguintes enzimas de restrição (técnica de ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis): SphI, NcoI, NheI, SspI, SfuI, EcoRV, DraI, VspI, HincII, EcoRI e HindIII, segundo Moreira et al. (2005). A temperatura de reação foi de 37°C para todas as enzimas, exceto para SfuI, onde se empregou 65°C.

As reações de hidrólise foram realizadas em tubos de PCR de 0,2mL por 1 hora e 30 minutos em banho-maria. Para as enzimas: NcoI, SspI, SfuI, EcoRV, DraI, VspI, EcoRI e HindIII utilizou-se reações de 15qL, cujas proporções são apresentadas na tabela 5.

**Tabela 5** – Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de hidrólise.

Reagentes	Volume (µL)
DNA eluído	10,0
Tampão	1,5
enzima	0,2
Água estéril	3,3
Total	15

Para as outras enzimas utilizadas: SphI, NheI e HincII as proporções são apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6** – Quantidades dos reagentes utilizados em cada reação de hidrólise com BSA.

Reagentes	Volume (µL)
DNA eluido	10,0
Tampão enzima	1,5
BSA (albumina do soro bovino)	0,2
Água estéril	1,5
Total	1,8

O padrão de digestão para cada enzima foi identificado a partir de eletroforese em gel de agarose 2% a uma voltagem constante de 90V por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio 20mg/ml e visualizado sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador de UV (Transiluminator – Loccus Biotecnologia). Na eletroforese foi adicionado, além dos 8 isolados submetidos à digestão enzimática, o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) e um controle positivo, com o DNA de um isolado não submetido à hidrólise.

Depois de verificado o resultado da hidrólise no gel, este foi fotografado com o fotodocumentador Kodak EDAS 290 e visualizado utilizando o programa Photoshop 5.0 (Twain 32).

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As linhagens de *Lactobacillus* aqui estudadas foram identificadas, molecularmente, quanto as suas espécies utilizando os resultados obtidos na técnica de ARDRA, comparando aos resultados de Moreira et al. (2005) que estudaram a identificação de *Lactobacillus* e outras bactérias do trato intestinal humano, de animais e de produtos alimentícios utilizando a mesma técnica. Pois a identificação precisa dos isolados de lactobacilos é um aspecto importante para a seleção de linhagens probióticas (ANNUK et al., 2003).

## 5.5 DESENVOLVIMENTO DO LEITE PROBIÓTICO

Testes preliminares foram realizados em leite desnatado reconstituído (LDR - leite em pó desnatado da marca Molico, Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) 9,0%, no qual foram definidos os parâmetros de obtenção do produto probiótico.

A ativação da cultura ocorreu em caldo Lactobacillus MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) por 24 horas a 37°C e o crescimento ocorreu a partir da adição de 4% do inoculo ativado da linhagem L20 em LDR esterilizado a 121°C por 15 minutos em erlenmeyer de 500 mL, sendo a incubação a 37°C, segundo Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) por 15 horas. O volume final do leite foi de 250 mL.

Segundo Brasil (2000), para se determinar quando a fermentação deve ser finalizada, pode-se utilizar como parâmetro a porcentagem de ácido láctico, sendo que o valor deve ser de no mínimo 0,60%, para que haja inibição do crescimento de bactérias patogênicas ou deteriorantes que eventualmente estejam presentes no produto. Desta maneira, o critério para se considerar o produto fermentado neste trabalho foi estabelecido na concentração de 0,8% de ácido láctico, conforme Tamime e Robinson (1985).

Após o período de incubação o leite probiótico foi resfriado a temperatura ambiente e adicionado 0,24% de aroma artificial de baunilha (Dr. Oetker Brasil LTDA.). Este ingrediente costuma ser adicionado no final do processamento porque o tratamento térmico leva à perda de compostos voláteis, prejudicando o aroma (ANTUNES et al. 2007).

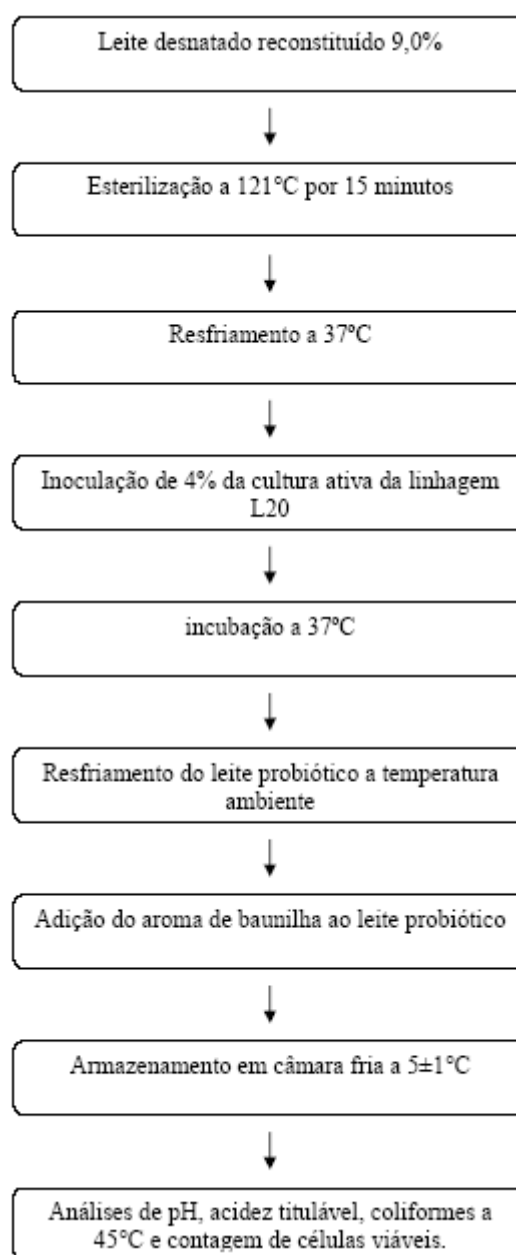
Avaliou-se o pH, a acidez titulável, coliformes a 45°C e a concentração de células viáveis. A avaliação do pH foi feita em potenciômetro Tec-3MP (Tecnal) depois da calibração feita com tampão padrão de pH 4,0 e outro de pH 7,0, a acidez titulável determinada por titulação com solução de NaOH 0,1N e fenolftaleína como indicador, conforme a metodologia da AOAC (1995), expressa em porcentagem de ácido láctico e a análise para coliformes a 45°C, segundo LANARA (1981).

A concentração de células viáveis foi determinada através do método de plaqueamento em profundidade (“pour-plate”) em meio Lactobacillus MRS ágar (Himedia Laboratories Pvt. Ltd.), utilizando-se diluições seriadas com água peptonada tamponada 0,1% (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan), necessárias à análise do produto. A incubação foi realizada a 37°C, sob aerobiose, com as placas invertidas, sendo as contagens realizadas após 48 horas, em placas contendo de 30 a 300 colônias, e os resultados expressos em UFC/ mL (unidades formadoras de colônia por mL).

Para a produção do leite probiótico, a avaliação de pH e a acidez titulável fez-se três repetições e para a contagem de células viáveis fez-se placas em duplicatas.

Os leites probióticos foram mantidos em câmara fria por 60 dias, conforme Patrignani et al. (2006) à temperatura de  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  e as análises de pH, acidez titulável e concentração de células viáveis foram realizadas a cada 15 dias para se verificar esses padrões durante a estocagem. Estas análises também foram realizadas no tempo zero e na pós-incubação do leite.

Na figura 2 é apresentado o fluxograma do leite probiótico produzido com a linhagem L20. A avaliação sensorial do leite probiótico produzido será realizada, após testes de segurança para o consumidor, em trabalho posterior.



**Figura 2** – Fluxograma do leite probiótico produzido com a linhagem L20.

## 5.6 ANÁLISES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Seis marcas de leite fermentado comercializadas nos supermercados de Londrina – PR foram analisadas quanto às características físico-químicas e microbiológicas. As amostras analisadas pertenciam a dois lotes diferentes de fabricação e foram adquiridas em épocas distintas. Para a análise de pH e acidez titulável realizou-se três repetições e para a concentração de células viáveis foram analisadas placas em duplicata, sendo feita somente contagem total de bactérias viáveis, não se identificando cada espécie.

Os frascos de leite fermentado foram homogeneizados por agitação leve e abertos assepticamente, retirando-se uma alíquota para a realização das análises.

As análises de pH e acidez titulável foram conduzidas conforme o procedimento utilizado para a produção do leite probiótico, sendo realizadas, inclusive para a contagem de células viáveis, em três repetições.

As placas de contagem foram feitas com meio *Lactobacillus* MRS ágar utilizando-se diluições seriadas com água peptonada tamponada 0,1%, necessárias à análise do produto. A incubação foi realizada sob aerobiose a 37°C com as placas invertidas e as contagens foram realizadas após 48 horas em placas, contendo de 30 a 300 colônias e os resultados expressos em UFC/ mL (unidades formadoras de colônia por mL).

As amostras foram testadas em data próxima à fabricação e também no final do prazo de validade para se verificar possíveis alterações nos parâmetros durante a vida de prateleira do produto. As amostras foram mantidas em câmara fria a temperatura abaixo de 10°C, conforme solicitado pelos fabricantes.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

A metodologia de ARDRA consiste em submeter um fragmento de DNA à técnica de PCR seguida, por uma hidrólise dos produtos por meio de enzimas de restrição, portanto, obteve-se os resultados apresentados na tabela 7, que mostra o padrão de digestão das 11 enzimas (*NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SphI*) utilizadas para as oito amostras testados neste trabalho..

**Tabela 7** – Resultados das reações de hidrólise das oito amostras de DNA analisados.

	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRV</i>	<i>SphI</i>
L4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L19	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L20	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L22	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L23	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Hidrólise positiva. - : Hidrólise negativa.

Estes resultados foram comparados com as tabelas 8 e 9, apresentadas a seguir, de Moreira et al. (2005), que estudaram a identificação de *Lactobacillus* e outras bactérias do trato intestinal humano, de animais e de produtos alimentícios utilizando a técnica de ARDRA.

Comparando-se a tabela dos resultados obtidos neste trabalho com as tabelas apresentadas por Moreira et al. (2005) sugere-se que as linhagens L4, L5 e L12 pertencem às espécies *Enterococcus faecalis* e/ ou *Enterococcus faecium*. As linhagens L19, L20, L22 e L23 à espécie *Lactobacillus plantarum* a e, por último, a linhagem L24 à espécie *Bifidobacterium lactis*.

No caso das espécies identificadas como *Lactobacillus plantarum* a, comparando com a tabela 8 de Moreira et al. (2005) observou-se que a enzima *SphI* não hidrolisou as amostras de DNA. Esta linhagem necessita de uma investigação maior, uma vez que não se pôde comprovar a identificação da espécie através das enzimas utilizadas neste trabalho. Uma das hipóteses sugeridas é que a ocorrência de uma mutação ocasionou a perda do sítio de restrição para a enzima *SphI* nesta linhagem. De acordo com Sybesma et al., (2006) mutações espontâneas podem ocorrer naturalmente em culturas de bactérias ácido-lácticas, por inserção de elementos na seqüência gênica, devido à radiação, replicação ou transcrição errônea no DNA, além de outros fatores.

**Tabela 8** – Padrão de digestão de espaçadores intergênicos curtos 16S-23S em diferentes espécies de *Lactobacillus*.

	<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfiI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>
<i>Lact. delbrueckii</i>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. amylophilus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Lact. acidophilus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lact. amylovorus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lact. helveticus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lact. crispatus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Lact. perolens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lact. gossleri</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lact. johnsonii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lact. jensenii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lact. reuteri</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lact. vaginalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	++ <sup>b</sup>	-	-	+
<i>Lact. brevis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Lact. sakei</i>	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+
<i>Lact. casei</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Lact. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lact. salivarius</i>	-	-	-	+	-	-	++	+	+	-	-
<i>Lact. nummii</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Lact. plantarum a</i>	+	-	-	+	2 <sup>a</sup>	-	-	+	+	-	-
<i>Lact. plantarum b</i>	+	-	-	+	4 <sup>c</sup>	-	-	+	+	-	-
<i>Lact. fermentum</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

<sup>a</sup>: sinais de + e - representam digestão positiva e negativa, respectivamente.

<sup>b</sup>: dois ou mais sítios de restrições encontrados dentro da região espaçadora.

<sup>c</sup>: sítio polimórfico presente em algumas linhagens de *L. plantarum* e ausente em outras.

Fonte: Moreira et al. (2005).

Neste trabalho não foram diferenciadas as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* devido à grande similaridade do padrão genético entre as duas espécies. Segundo Moreira et al. (2005) embora para a maioria das bactérias existam diferentes padrões de restrição, algumas espécies apresentam padrões idênticos como é evidenciado neste caso. Entretanto, elas poderiam ser diferenciadas pelo tamanho de duas bandas amplificadas (os amplicons de *E. faecium* são quase 100 pares de base maiores do que *E. faecalis*). Analisando estes dados, é possível inferir que a linhagem L12 refere-se a espécie *Enterococcus faecium*;

para esta linhagem observa-se uma menor progressão das bandas características no gel de agarose (figura 3 e 4), talvez por apresentar um maior fragmento de DNA comparado a outra espécie. Desta maneira, as linhagens L4 e L5 pertenceriam a espécie *Enterococcus faecalis*.

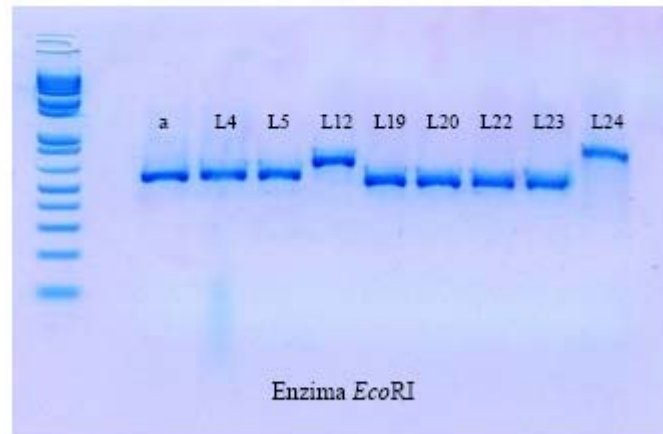
**Tabela 9** – Padrão de digestão de espaçadores intergênicos curtos 16S-23S em diferentes espécies de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*.

	SphI	NcoI	NheI	SspI	SfiI	EcoRV	DraI	VspI	HincII	EcoRI	AvaII	HindIII
<i>Bact. fragilis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. longum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. piscicola</i>	-	-	-	+	-	-	+++	-	-	-	-	+
<i>C. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	+
<i>C. mobile</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Ent. faecalis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. faecium</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. raffinosus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Leuc. mesenteroides</i>	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	+
<i>O. oeni</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Ped. acidilactii</i>	+	-	+	-	-	-	+	++	-	-	-	+
<i>Ped. parvulus</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>P. freudenreichii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staph. aureus</i>	+	-	+	+	+	-	+++	+	+	+	-	++
<i>Strept. thermophilus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. confusa</i>	-	-	-	+	-	-	+++	-	-	-	-	+
<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-

a: dois ou mais sítios encontrados dentro da região espaçadora.

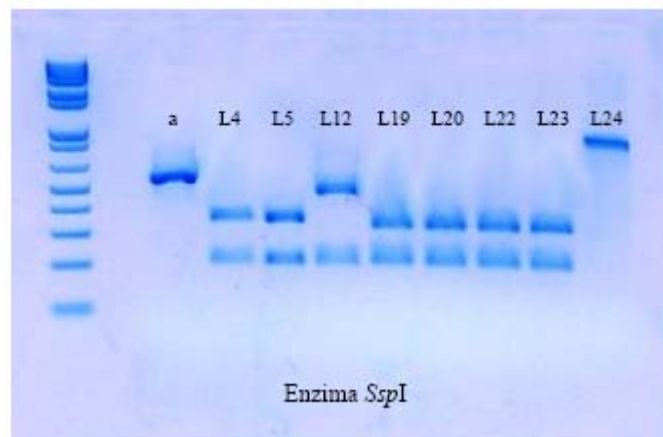
**Fonte:** Moreira et al. (2005).

A seguir, são apresentadas imagens de dois géis, onde da esquerda para a direita cada banda em azul representa, respectivamente: o marcador de peso molecular, uma amostra de DNA eluído sem ser submetido à hidrólise (a) e as amostras L4, L5, L12, L19, L20, L22, L23 e L24 submetidas à reação enzimática. O primeiro gel obtido por ação da enzima EcoRI (figura 3) não apresentou hidrólise com nenhuma amostra de DNA, nota-se ausência de hidrólise representada por uma única banda no gel e o segundo gel mostra a reação com a enzima SspI (figura 4) cujo resultado mostrou que houve digestão nas amostras de DNA L4, L5, L12, L19, L20, L22 e L23 (digestão representada por duas bandas no gel), exceto na amostra L24, pois esta linhagem não apresenta sítio de restrição para nenhuma das onze enzimas utilizadas.



**Figura 3** – Foto da hidrólise com a enzima *EcoRI*.

a: amostra de DNA eluído sem ser submetido à hidrólise.



**Figura 4** – Foto da hidrólise com a enzima *SspI*.

a: amostra de DNA eluído sem ser submetido à hidrólise.

## 6.2 DESENVOLVIMENTO DO LEITE PROBIÓTICO

A linhagem escolhida para a fabricação do leite probiótico foi a L20 da espécie *Lactobacillus plantarum*. Pois algumas linhagens de *Enterococcus*, incluindo o *E. faecium* e o *E. faecalis*, apesar de também serem utilizados como probióticos, são considerados patógenos nosocomiais que podem causar bacteremia, endocardite e outras infecções oportunistas (HOLZAPFEL et al., 2001; FRANZ et al., 2003; FAO-WHO, 2006). Além disso, estas linhagens podem ser resistentes ao antibiótico vancomicina e transferir esta resistência a outras bactérias. Embora, linhagens humanas que foram isoladas de crianças

saudáveis podem implicar segurança (MATTILA-SANDHOLM; MÄTTÖ; SAARELA, 1999). E a espécie *Bifidobacterium lactis* já é comercializada em produtos probióticos. A linhagem L20, em relação às outras três linhagens da mesma espécie, foi a que apresentou a maior resistência, aos sais biliares, fenol e a acidez gástrica quando testadas por Pozza (2006).

Linhagens de *L. plantarum* são vendidas no mercado europeu e em outros países como probióticos (CEBECI; GÜRAKAN, 2003), entretanto no Brasil esta espécie ainda não é comercializada em produtos.

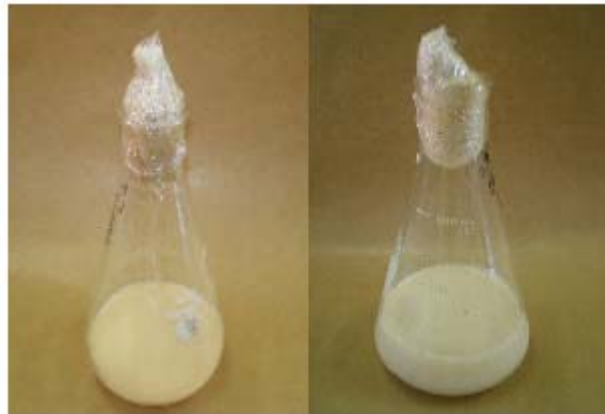
Muitas são as qualidades atribuídas a esta espécie por colaborar com a melhora da saúde do consumidor, entre essas qualidades podemos citar o trabalho de Naruszewicz et al. (2002) relatando que a administração da linhagem 299v oriunda de intestino humano leva a uma redução dos fatores de risco de doenças cardiovasculares e poderia ainda ser útil como um agente protetor na prevenção primária da aterosclerose em fumantes. Johansson et al. (1993) também estudou esta linhagem e constatou em seu estudo que ela se adere as células intestinais ajudando na modulação da flora intestinal. *L. plantarum* tem uma longa história de ocorrência natural e de utilização segura em uma variedade de produtos alimentares e vários estudos clínicos, enfatizam a utilização segura desta espécie em seres humanos (VRIES et al., 2006).

Ao produzir um produto fermentado contendo probiótico, uma temperatura de fermentação de 37 - 40°C, geralmente, é recomendada, baseado na temperatura adequada à maioria das linhagens probióticas (SAARELA et al., 2000).

Na temperatura de 37°C, a taxa metabólica do *L. plantarum* é elevada demonstrando ser essa sua temperatura ótima de crescimento. Surono et al. (2008) estudaram a capacidade de duas linhagens desta espécie de remover a toxina microcistina - LR de cianobactérias de solução aquosa e obtiveram bons resultados a 37°C, o que não foi verificado com tanta eficiência a 22°C.

A legislação brasileira preconiza que um leite fermentado deve possuir acidez titulável de 0,60%; com a linhagem escolhida esta característica não foi obtida, sendo então classificado como um leite probiótico, entretanto a viabilidade do microrganismo se manteve superior à recomendação pela ANVISA.

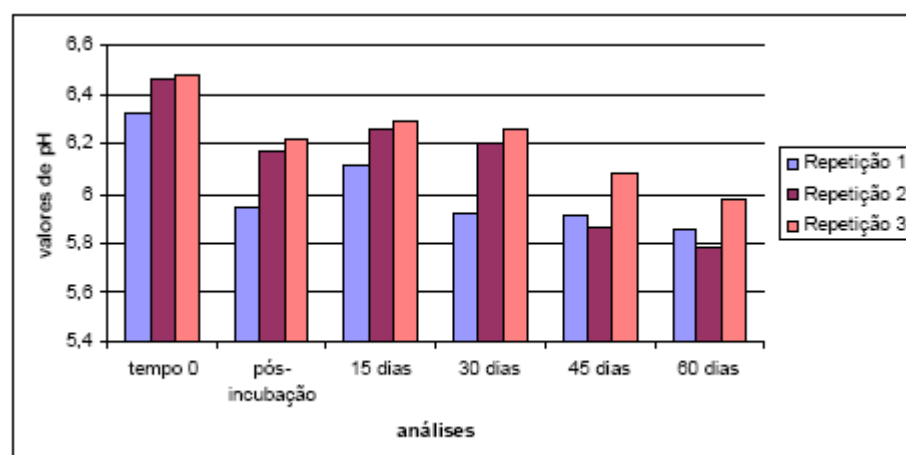
O leite probiótico produzido (figura 5) apresentou-se na forma líquida, com ausência de coágulo após o período de incubação, acidez média de 0,30% após 15 horas de incubação, coloração bege claro (devido ao tratamento térmico aplicado). Odor característico de leite aquecido e suave aroma de baunilha.



**Figura 5** – Duas repetições do leite probiótico produzido.

A média dos resultados das análises de pH dos três leites probióticos com a linhagem L20 estão apresentadas no gráfico 1.

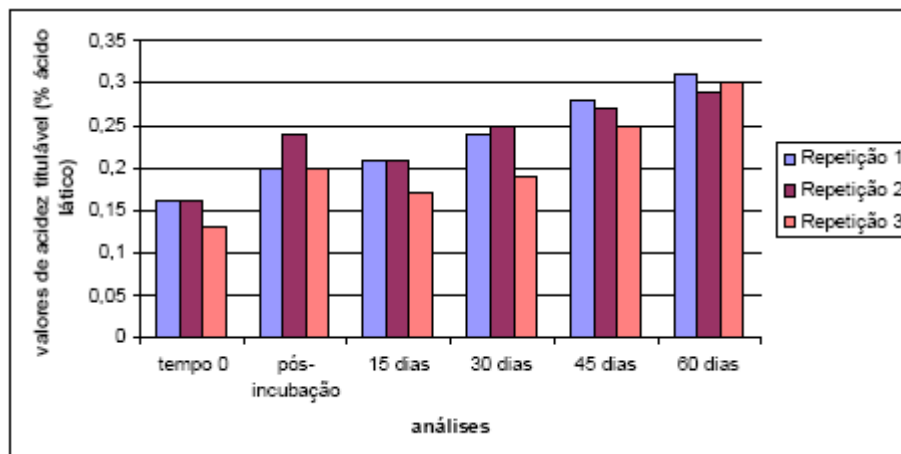
Nas três repetições efetuadas, os valores de pH, sofreram discretas variações, iniciando-se com um valor médio de 6,42 e sendo 5,78 o menor índice obtido na repetição 2 ao final dos 60 dias de armazenamento refrigerado, diferentemente de Lee e Salminen (1995) que relatam pH inicial entre 4,5 e 5,0, podendo chegar a 4,0, durante a vida-de-prateleira para um produto fermentado sem, no entanto, ter um efeito prejudicial sobre a viabilidade das bactérias probióticas.



**Figura 6** – Média dos resultados das análises de pH dos três leites probióticos com a linhagem L20.

A média inicial da acidez titulável das amostras de leite probiótico (gráfico 2) foi de 0,15% e ao final do tempo de estocagem apresentou-se entre 0,29 e 0,31. Esses valores de acidez demonstram que a linhagem escolhida de *Lactobacillus plantarum* para a

fermentação do leite apresenta uma pós-acidificação bem lenta, uma característica desejável para garantir a viabilidade dos microrganismos no produto durante a vida de prateleira.



**Figura 7** – Média dos resultados das análises de acidez titulável dos três leites probióticos com a linhagem L20.

Saarela et al. (2000) afirmam que todos os alimentos probióticos devem ter boas propriedades sensoriais. E segundo Gardini et al. (1999) e Vinderola et al. (2002) as características sensoriais dos leites fermentados desempenham um importante papel na aceitação do produto pelos consumidores. Assim, o leite probiótico produzido com a linhagem L20 de *Lactobacillus plantarum* por apresentar uma baixa acidez, favorece sua aceitabilidade pelos consumidores que não consomem leite fermentado devido à alta acidez do produto. Pois a acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados e é um dos fatores que limita sua aceitação (THAMER; PENNA, 2006).

Atendendo aos padrões de higiene e qualidade exigidas a este produto, todas as repetições do leite probiótico se mostraram negativas para a análise de coliformes a 45°C. E a adição do aroma, efetuado no final do processamento, não representou risco de contaminação do produto (ANTUNES et al., 2007), contribuindo para o sabor do leite probiótico, pois os produtos lácteos são consumidos principalmente devido a seu sabor (VINDEROLA et al., 2002).

Patrignani et al. (2006) relataram que leites fermentados obtidos a partir da utilização direta e exclusiva das linhagens probióticas são muitas vezes caracterizados pela falta de características sensoriais desejáveis. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho, evidenciaram características físico-químicas e microbiológicas desejáveis ao leite probiótico,

e apesar da não avaliação por um painel sensorial o produto foi caracterizado como de sabor e aroma agradáveis.

As contagens de células viáveis durante os 60 dias de armazenamento estão apresentadas na tabela 10.

**Tabela 10** – Média dos resultados das análises de células viáveis das três repetições produzidas de leite probiótico.

Repetições	Contagem de Células Viáveis (UFC/mL)					
	Tempo 0	Pós-incubação	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
1	$2,00 \times 10^6$	$1,16 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$9,65 \times 10^7$	$6,60 \times 10^7$	$2,16 \times 10^7$
2	$1,81 \times 10^6$	$9,70 \times 10^7$	$7,65 \times 10^7$	$6,20 \times 10^7$	$5,50 \times 10^7$	$2,98 \times 10^7$
3	$1,33 \times 10^6$	$6,95 \times 10^7$	$6,25 \times 10^7$	$5,20 \times 10^7$	$2,14 \times 10^7$	$1,02 \times 10^7$

A alta viabilidade dos microrganismos probióticos é considerada parâmetro essencial para o desenvolvimento de alimentos probióticos e é pré-requisito indispensável para a funcionalidade do produto, além de ser essencial durante o período de armazenamento para produzir os benefícios terapêuticos em quem o consome (GARDINI et al., 1999; SAARELA et al., 2000; GUEIMONDE, M.; SALMINEN, 2006; LACROIX; YILDIRIM, 2007).

As contagens de células viáveis dos leites probióticos produzidos foram realizadas durante o armazenamento, no período de 60 dias, assim verificou-se que o *L. plantarum* manteve alta viabilidade no leite probiótico, mantendo contagem superior ao estabelecido pela legislação brasileira, que preconiza um mínimo de  $10^6$  UFC/ mL (BRASIL, 2008). No entanto, vários estudos têm demonstrado que probióticos não - viáveis podem promover efeitos benéficos. Como por exemplo, no caso de tolerância à lactose por pessoas lactasedeficientes, leites cultivados por microrganismos viáveis e não viáveis mostram efeitos semelhantes, assim como no caso do tratamento de gastroenterite aguda, onde alguns probióticos mostram eficácia clínica em diminuir a duração da diarreia, tanto na forma viável como não viável (OUWEHAND; SALMINEN, 1998).

A temperatura de armazenamento de 5°C mostrou-se adequada para a preservação da cultura no produto, mantendo a viabilidade dos microrganismos até o final dos 60 dias propostos.

Devido ao seu fraco crescimento em leite, a quantidade de inóculo para probióticos é normalmente superior (5-10%) do que é utilizado, por exemplo, para culturas starters de iogurte (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Neste trabalho, utilizamos 4% de inóculo, o que mostrou ser uma quantidade suficiente para considerar o leite produzido como probiótico. A cultura utilizada cresceu muito bem no leite, fato evidenciado pelas contagens de células viáveis que se apresentaram totalmente adequadas, discordando dos autores citados.

De acordo com Lacroix e Yildirim (2007), a capacidade dos microrganismos de crescer e sobreviver depende, em grande parte, da sua capacidade de adaptação às mudanças ambientais. Isto foi provado pela linhagem escolhida neste trabalho para a produção do leite probiótico, pois os microrganismos cresceram e sobreviveram no leite, um meio totalmente diferente do intestino de onde a linhagem foi isolada. Na avaliação da concentração de células viáveis verificou-se nas placas o crescimento de colônias pequenas de cor creme-clara e apresentando um formato discóide, caracterizando, portanto, as qualidades fenotípicas e fisiológicas típicas de lactobacilos (figura 6)



**Figura 8** – Contagem de células viáveis (técnica “pour-plate”) de *L. plantarum* após 48 horas de incubação.

A viabilidade da espécie utilizada manteve-se acima de  $10^7$  UFC/ mL durante os 60 dias de armazenamento na câmara fria a  $5^{\circ}\text{C}$ , resultado semelhante ao encontrado por Patrignani et al., (2006) relatando que a viabilidade dos microrganismos pode representar um princípio para a seleção de linhagens probióticas para empregar em produtos como leite fermentado. Assim, pode-se dizer que a espécie *L. plantarum* é capaz de manter-se viável no leite durante o armazenamento refrigerado, sendo um dos requisitos exigidos para se considerar o produto como probiótico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite e ser estáveis e viáveis durante armazenamento (SAAD, 2006). Dentro do exposto, esta linhagem de *L. plantarum* apresenta boa propriedade tecnológica, considerando-se a metodologia aplicada.

Estes dados corroboram com Lee e Salminen (1995) que relataram que entre as várias bactérias probióticas, *L. casei* e *L. plantarum* parecem ter uma vida de prateleira mais longa do que *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium* spp. em leite cultivado. No entanto, a razão para a diferença da estabilidade destas bactérias no leite cultivado não é totalmente esclarecida. Esses dados também foram observados no trabalho de Faria, Benedet e Lê Guerroue (2006) que testaram a viabilidade de *L. casei*, verificando valores acima de 10<sup>6</sup> UFC/ mL durante os 30 dias de armazenamento a 5 e 10°C.

McDonald, Fleming e Hassan (1990) também concordam e atribuem a capacidade de tolerar pH interno mais baixo a um mecanismo que permite o *L. plantarum* sobreviver na cultura em valores de pH inferiores, ou seja, esta espécie possui uma boa estabilidade em um leite probiótico.

No leite probiótico produzido com *Lactobacillus plantarum*, considerando que os parâmetros iniciais de pH, acidez titulável e concentração de células viáveis foram adequados para a produção e que as repetições, dentro dos limites aceitáveis, mantiveram-se aptas para consumo depois de 60 dias de estocagem, foi possível afirmar que, o produto pode ser elaborado, dentro as condições experimentais, sem que ocorra um grande aumento da acidez e do pH ou uma alta redução do número de microrganismos viáveis.

De acordo com Saad (2006) apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. serem consideradas seguras (GRAS) é necessário a determinação da segurança na utilização da linhagem antes do lançamento e da divulgação de um novo produto, assim apesar dos testes realizados com a linhagem de *Lactobacillus plantarum* ainda são necessários outros procedimentos para se considerar esta linhagem segura, como por exemplo, testar se a resistência ao antibiótico estreptomicina observada por Pozza (2006) é intrínseca ou adquirida; se não causa infecção ou algum efeito colateral ao hospedeiro que a ingerir. Mas Surono et al. (2008) afirmam em seu estudo que linhagens de *L. plantarum* são seguras e podem ser adicionados aos alimentos e bebidas.

No indivíduo que já possui sua microbiota estabelecida, a influência dos probióticos, geralmente, limita-se ao período em que são consumidos. Assim, para que se consiga uma mudança na microbiota intestinal, os probióticos deverão ser consumidos continuamente e indefinidamente (CHEN; WALKER, 2005).

### 6.3 ANÁLISES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

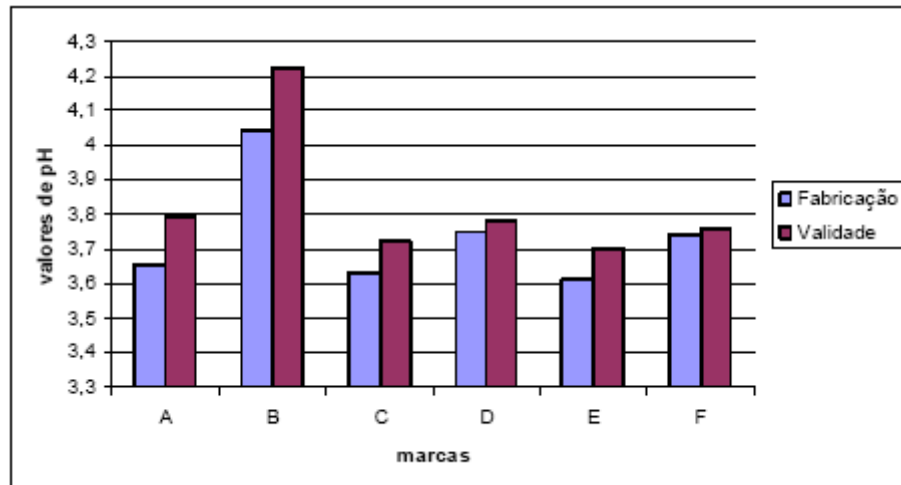
Para se avaliar as características e viabilidade de leite fermentado comumente comercializados no mercado brasileiro, alguns produtos foram avaliados. Apenas quatro amostras comerciais (A, D, E e F) das 6 analisadas apresentam na embalagem e/ ou rótulo a (s) espécie (s) de microrganismo (s) presente (s) no produto. Muitos fabricantes se limitam a informar na lista de ingredientes que o produto contém “fermentos lácteos”; além disso, afirmam que a linhagem de microrganismo presente no produto, bem como o número de células viáveis desta cultura, é que determina se o leite fermentado é ou não considerado um probiótico (ANTUNES et al. 2007). Sendo assim, necessária a informação presente no rótulo do produto.

Um estudo feito por Temmerman et al. (2003) com alguns produtos encontrados no mercado internacional apresentaram rotulagem em desacordo com o microrganismo presente, nem todas as espécies declaradas nos rótulos foram encontradas nos produtos analisados, bem como quantidades baixas de células viáveis das culturas probióticas presentes.

De acordo com a ANVISA (2008) a quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação: “O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudável”, mas nenhuma das 6 marcas analisadas informou a quantidade de microrganismos presentes no produto e quanto à alegação, somente uma marca (A) apresentou no rótulo do produto uma alegação com os seguintes dizeres: “Alimento com alegações de propriedades funcionais e/ ou de saúde”, diferindo da alegação recomendada pela ANVISA.

A tabela 11 apresenta as principais características dos leites fermentados comerciais vendidos nos supermercados de Londrina-PR.

Os gráficos 3 e 4 apresentam, respectivamente, os valores médios de pH e acidez titulável dos leites fermentados comerciais e os valores médios obtidos com a análise das células viáveis são apresentados na tabela 12.



**Figura 9**– Média dos resultados das análises de pH dos leites fermentados comerciais.

**Tabela 11** – Leites fermentados comercializados nos supermercados de Londrina-PR.

Produto	Espécies	Embalagem	Ingredientes Principais	Ingredientes Adicionais	Informação SAC***
A*	<i>L. casei</i> Shirota	Plástica, 80g	LD ou LDR	açúcar, glicose e aroma.	$16 \times 10^9$ UFC/80g
B**	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. paracasei</i> , bifidobactéria e <i>Streptococcus salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i> .	Plástica, 80g	Leite e/ou leite reconstituído	preparado de laranja (xarope de açúcar, suco de laranja concentrado, estabilizante pectina, acidulante ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de frutas cítricas, vitaminas, corante natural de urucum, conservante sorbato de potássio).	$10^7$ UFC/ 80g
C**	<i>L. casei</i>	Plástica, 65g	LD ou LDR	água, açúcar, dextrose e aroma idêntico ao natural de baunilha. Contém glúten. Pode conter traços de castanha de caju.	$10^6$ UFC/ 65g
D*	<i>L. paracasei</i>	Plástica, 80g	LDR	xarope de açúcar, açúcar invertido e aromatizantes.	$10^9$ UFC/ 80g
E*	<i>L. casei</i>	Plástica, 65g	LD ou LDR	água, açúcar, dextrose e aroma idêntico ao natural de baunilha. Contém glúten. Pode conter traços de castanha de caju.	$10^6$ UFC/ 65g
F*	<i>L. casei</i> e <i>L. acidophilus</i>	Plástica, 80g	LDR, LD in natura ou reconstituído	xarope de açúcar, dextrose e aroma natural composto de frutas cítricas e artificial de baunilha.	$40 \times 10^6$ UFC de cada espécie/ 80g

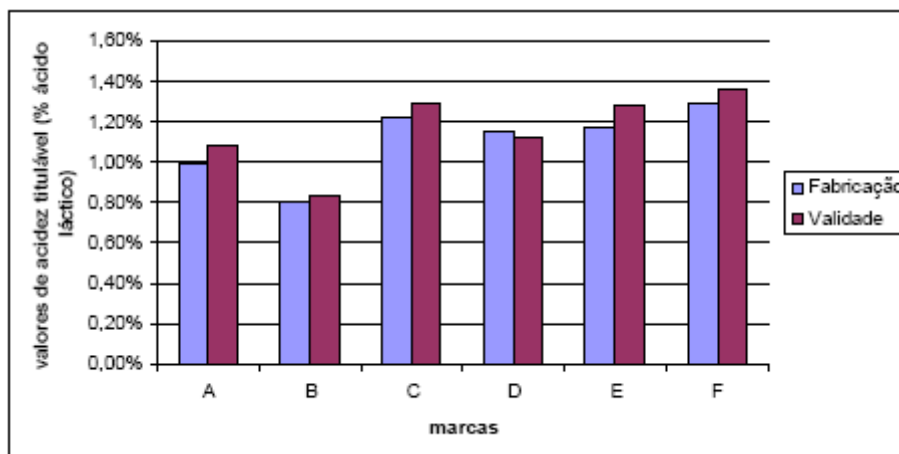
\* Não informa a quantidade de células viáveis no produto, mas informa a espécie utilizada na fabricação.

\*\* Não informa a quantidade de células viáveis no produto e a espécie utilizada na fabricação.

\*\*\* Quantidade mínima informada pelo serviço de atendimento ao consumidor (SAC).

LDR: Leite em pó desnatado reconstituído.

LD: Leite desnatado.



**Figura 10** – Média dos resultados das análises de acidez titulável dos leites fermentados comerciais.

**Tabela 12** – Resultados médios da análise de células viáveis dos leites fermentados comerciais.

Marcas	Contagem de Células Viáveis*	
	Fabricação	Validade
A	$7,00 \times 10^9$	$5,60 \times 10^8$
B	$1,99 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$
C	$1,40 \times 10^9$	$4,55 \times 10^8$
D	$1,43 \times 10^{10}$	$1,17 \times 10^8$
E	$1,69 \times 10^9$	$1,60 \times 10^9$
F	$3,73 \times 10^6$	$2,23 \times 10^6$

\* UFC/ mL.

O pH das amostras comerciais dos leites fermentados analisados não tiveram muita variação dentro do período de validade estando entre 3,46 e 4,19.

Os valores de acidez titulável apresentados pelas 6 marcas comerciais de leite fermentado estiveram dentro dos limites impostos pela legislação brasileira (Brasil, 2008), que preconiza um valor de acidez titulável entre 0,6% e 2,0% para todo leite fermentado, ou seja, no produto devem estar presente no mínimo 0,6g de ácido láctico/ 100g de produto e no máximo 2,0g/ 100g. O maior valor de acidez encontrado foi na amostra F (primeiro lote) na data de validade, 1,53%, mesmo assim, dentro dos padrões previstos.

Os valores de acidez não alteraram bruscamente, a maior alteração ocorreu com as amostras A e F, uma variação de 0,13%.

É preciso, também, que estes produtos tenham sido fabricados adequadamente e estocados na temperatura de refrigeração correta para apresentarem

quantidade alta de microrganismos probióticos viáveis (ANTUNES et al. 2007). O que pode ser observado para todas as marcas comerciais, pois a contagem total de células viáveis esteve dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente, que estipula uma contagem mínima de bactérias lácticas totais de  $10^6$  UFC/ mL (BRASIL, 2008) dentro do prazo de validade do produto. Estes dados concordam com Barreto et al. (2003) que quantificaram as células viáveis totais de linhagens probióticas em produtos comercializados no Brasil, como o leite fermentado. Mas quando fizeram contagens de *L. acidophilus* e de bifidobactérias em leites fermentados, em 60% e 64% das amostras, respectivamente, os valores ficaram abaixo de  $10^5$  UFC/g. A perda de viabilidade dessas linhagens não se mostrou relacionada ao tempo de estocagem, sendo mais provável que decorram da sensibilidade às próprias condições de processo. Assim, pode-se inferir que para as marcas analisadas o processamento dos produtos não prejudicou a viabilidade das culturas probióticas.

Apenas a marca F apresentou uma contagem mais baixa ( $10^6$  UFC/ mL). Entretanto, todas as marcas, inclusive a F, estão de acordo com os padrões informados pelo SAC de cada empresa para a quantidade de células viáveis presentes em cada frasco do produto.

## 7 CONCLUSÃO

A utilização da metodologia de ARDRA possibilitou a classificação das oito linhagens potencialmente probióticas, cujas espécies são: *Enterococcus faecalis* (2), *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* (04) e *Bifidobacterium lactis*.

A linhagem L20 identificada como *Lactobacillus plantarum* apresentou características favoráveis à produção de um leite probiótico, atingindo uma concentração de células viáveis acima de  $10^7$  UFC/ml e esta contagem foi mantida por, no mínimo, 60 dias durante a estocagem a 5°C.

As análises das amostras comerciais de leite fermentado avaliadas nesse estudo apresentaram-se dentro das normas vigentes da legislação brasileira, e se mostraram adequadas ao consumo dentro do prazo de validade estipulado pelos fabricantes.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 68, p. 171–178, 1999.
- AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, v. 24, p. 559–570, 2007.
- ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J. ; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 403–412, 2003.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>> Acesso em: 09 maio 2008.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Resolução RDC nº. 2, de 07 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567&word=>> Acesso em: 28 maio 2008.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - 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](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 09 maio 2008.
- AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. v.II, n. 970.124, Virginia: AOAC International, 1995.
- BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. *Braz. J. Food Technol.*, v. 6, n. 1, p.119-126, 2003.
- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.*, v. 1, p. 51-56, 1991.

BERNARDEAU, M.; GUGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments FEMS Microbiol Rev, v. 30, p. 487–513, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº. 05 de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília, 2007.

BROWN, J. R. Ancient Horizontal Gene Transfer. Nature Reviews-Genetics. v. 4, p. 121-132, 2003.

CEBECI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology, n. 20, p. 511–518, 2003.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v.84, p.759-768, 1998.

CHEN, C.; WALKER, W. A. Probiotics and Prebiotics: Role in Clinical Disease States. Advances in Pediatrics, v. 52, cap. 5, 2005.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; O’SULLIVAN, G. Selection of probiotic strains for human applications. International Dairy Journal, Barking, v.8, p.487-490, 1998.

CONWAY, P. L.; GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells. Journal of Dairy Science., v.70, p. 1-12, 1987.

DUNE, C.; O’MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O’HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O’SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American Journal of Clinical Nutrition. v.73 (suppl), p.386S-392S, 2001.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, Barking, v.55, p.297-300, 2000.

FAO-WHO (Food and Agriculture Organization-World Health Organization). Probiotics in food-Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. 2006.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.41, n.3, p.511-516, 2006.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GLENN, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, v.9, n1, p.53-61, 1999.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R.. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, v. 88 (Suppl. 1), p. S39-S49, 2002.

FRANZ, C. M.A.P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, p.105-122, 2003.

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

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p.495-500, 1995.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 125-134, 1999.

GILLILAND, S. E. Acidophilus Milk Products: A Review of Potential Benefits to Consumers. *J Dairy Sci*, v. 72, p. 2483-2494, 1989.

GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.33, p.15-18, 1987.

GOLDBERG, I. (Ed). *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. New York: Chapman & Hall Inc., cap.9, 14 e 20, 1994. Disponível em: <[http://www.setor1.com.br/funcionais/bacte\\_latica.htm](http://www.setor1.com.br/funcionais/bacte_latica.htm)>. Acesso em: 01 dez. 2007.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Probiotics for humans. In: FULLER, R. (Ed) *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman & Hall, p. 355-366, 1992.

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v.80, n.4, p. S203-S207, 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 10, p.139-157, 1999a.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, 1999b.

GORBACH, S. L., Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterology*, v. 95 (suppl 1), p. S2-S4, 2000.

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiology Letters*, v.127, p.85-91, 1995.

GUEIMONDE, M.; RAFAEL, F.; OUWEHAND, A. C. Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics. *Biologia*, v.61, n.6, p.755-760, 2006.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, v. 38, Suppl. 2, p. S242–S247, 2006.

GURR, M.I. Nutritional aspects of fermented milk products *FEMS Microbiology Letters*, v.46, n.3, p.337–342, 1987.

HAMILTON, J. M. M.; SHAH, S.; WINLHER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health and Nutrition*, v.2, n.2, p.223-229, 1999.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; GIBSON, G. R.; BRUCK, W. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *British Journal of Nutrition*, v. 90, p. 845, 2003.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Probiotics: a general review. In: WOOD, B. (Ed). *The lactic acid bacteria in health and disease*. Barking: Elsevier, p.151-170, 1992.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.73 (suppl), p.386S-392S, 2001.

HOLO, H.; JEKNIC, Z.; DAESCHEL, M.; STEVANOVIC, S.; NES, I. F. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, v. 147, p. 643–651, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73 (suppl), p. 365S-373S, 2001.

JOHANSSON, M. L.; MOLIN, G.; JEPPSSON, B.; NOBAEK, S. AHRNE, S.; BENGMARK, S. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p.15–20, 1993.

JOHANSSON, M. L.; NOBAEK, S.; BERGGREN, A.; NYMAN, M.; BJÖRCK, I.; AHRNÉ, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, p. 29–38, 1998.

KHALED, A. D. D.; NEILAN, B. A.; HERIKSSON, A.; CONWAY, P. L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v.153, p.191-197, 1997.

KIM, H. S.; GILLILAND, S. E. *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct for Milk to Aid Lactose Digestion in Humans. *Journal of Dairy Science*, v. 66, p. 959-966, 1983.

LACROIX, C; YILDIRIM, S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p.176-183, 2007.

LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal). Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. I – Métodos Microbiológicos, Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, p. 241-245, 1995.

LIN, W. H.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, v. 23, p. 74–81, 2006.

LUCHANSKY, J. B., TENNANT, M. C., KLAENHAMMER, T. R. Molecular cloning and DNA polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *L. gasseri*. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3293-3302, 1991.

McDONALD, L. C.; FLEMING, H. P.; HASSAN, H. M. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 7, p. 2120-2124, 1990.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br. Med. J.*, v. 318, p. 999-1003, 1999.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 69 (suppl), p. 1035S- 1045S, 1999.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, p.204-210, 2006.

MARSHALL, V. M.; TAMIME, A. Y. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, v. 50, n. 1, p. 35–41, 1997.

MARTINS, F. S., BARBOSA, F. H. F., PENNA, F. J., ROSA, C. A., NARDI, R. M. D., NEVES, M. J., NICOLI, J. R. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, n. 2, 2005.

MATTLA-SANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 25-35, 1999.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v. 5, n.1, p. 2-9, 1996.

MOORE, W. E. C., CATO, E. P.; HOLDEMAN, L. V. Some current concepts in intestinal bacteriology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 31 (suppl), p. 33S-42S, 1978.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. *Jornal de Pediatria*, v. 82 (5 Suppl), p. S189-S197, 2006.

MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S - 23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, v. 5, n. 15, p. 1-9, 2005.

- MOTA, R. M.; MOREIRA, J. L. S.; SOUZA, M. R.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2006.
- NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 22, n. 1, p. 05-22, 2000.
- NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 76, p. 1249–1255, 2002.
- NIKU-PAAVOLA, M.L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 29–35, 1999.
- NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, n. 252: p. 91–106, 2002
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res. Microbiol.*, n. 149, p. 433-448, 1998.
- ONECA, M.; IRIGOYEN, A.; ORTIGOSA, M.; TORRE, P. PCR and RAPD identification of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiology Letters*, v. 227, p. 271-277, 2003.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 749-758, 1998.
- PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KAN, S. A.; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, p. 1171–1185, 2006.
- PATRIGNANI, F.; R. LANCIOTTI, J. M. MATHARA, GUERZONI, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 1-11, 2006.
- PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Prebióticos e Probióticos na Nutrição de Aves. *Ciê. Agr. Saúde*, v. 2, n. 1, p. 59 – 64, 2002.

- PINTO, M. G. V.; FRANZ, C. M.A.P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, n. 109, p. 205–214, 2006.
- POZZA, M. S. S. Análise da variabilidade genética de isolados de *Lactobacilos*, susceptibilidade a condições do trato gastrointestinal e fermentação de oligofrutose, inulina e goma arábica por estes isolados. 2006. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. *Bifidobacteria and their role*. Basel: Birkhauser Verlag, p. 295, 1983.
- REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they? *TRENDS in Microbiology* v. 14, n. 8, 2006.
- REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Análises de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria*. Planaltina-DF: EMBRAPA CERRADO, 2004.
- RIVAS, B.; MARCOBAL, Á.; MUNÓZ, R. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, v. 152, p. 85–93, 2006.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v.25, p.39–67, 2001.
- ROY, D.; SIROIS, S.; VINCENT, D. Molecular Discrimination of *Lactobacilli* Used as Starter and Probiotic Cultures by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Current Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 282-289, 2001.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 42, n. 1, 2006.
- SAARELA, M; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MÄTTÖ J. ; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 197–215, 2000.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A. Current Probiotics - Safety Assured? *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 10, n. 2, p. 68-77, 1998.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W. M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, p. 93–106, 1998.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 107-110, 1999.

SANDERS, M.E. Probiotics. *Food Technology*, v. 53, p. 67-75, 1999.

SANDERS, M.E. Probiotics. *Dairy & Food Culture Technologies*, 2007.

SAXELIN M; CHUANG, N. H.; CHASSY, B.; RAUTELIN, H.; MÄKELÄ, P.H.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin Infect Dis*. v. 22, n. 3, p. 564-566, 1996.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73 (suppl), p. 361S–364S, 2001.

SCOLARI, G.; VESCOVO, M.; ZACCONI, C.; BATTISTOTTI, B. Phenotypic and genetic variability in *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains from different origin. *Annals of Microbiology*, v. 52, p.71-80, 2002.

SELLARS, R. L. Fermented Dairy Foods. *Journal Dairy Science*, v. 64, p. 1070 - 1076, 1981.

SETTANNI, L.; CORSETTI A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*, v. 69, n. 1, p. 1-22, 2007.

STANTON, C.; GARDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P. B.; ROSS, R. P. Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73 (suppl), p. 476S–83S, 2001.

SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – an overview. *Bolletín of the IDF.*, p. 23-29, 1996.

SURONO, I.S.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; MERILUOTO, J. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 502–507, 2008.

- SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J.; VOS, W. M.; SMID, E. J. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 4, 2006.
- TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, Suppl 4, p. S2–S15, 2002.
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. *Yoghurt – Science and Technology*. Pergamon Press, 1985.
- TEMMERMAN, R.; SCHEIRLINCK, I.; HUYS, G.; SWINGS, J. Culture-Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 220–226, 2003.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.
- TILSALA-TIMISJARVI, A. T., ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, p. 49-56, 1997.
- TYNKKYNEN, S.; SINGH, K. V.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 195-204, 1998.
- TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of food Microbiology*, v. 83, p. 233-244, 2003.
- C. L. VERNAZZA; B. A. RABIU; G. R. GIBSON (Ed.). *Prebiotics: Development and Application*, John Wiley & Sons, Ltd., p. 7 - , 2006.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 714–728, 2008.
- VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 579–589, 2002.
- VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, Barking, v. 36, p. 895-904, 2003.

VRIES, M.C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. International Dairy Journal, v. 16, p. 1018–1028, 2006.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium longum e Lactobacillus acidophilus. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.