

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Otimização das condições de cultivo laboratorial de bactérias lácticas e probióticas e avaliação do comportamento de *Lactobacillus casei* no trato gastrintestinal através de modelos simulados *in vitro*

Kátia Gianni de Carvalho Lima

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo
2005

18.214

DEDALUS - Acervo - CQ



30100011173

Ficha Catalográfica-

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L732o Lima, Kátia Gianni de Carvalho
Otimização das condições de cultivo laboratorial de bactérias
láticas e probióticas e avaliação do comportamento de
Lactobacillus casei no trato gastrintestinal através de modelos
simulados *in vitro* / Kátia Gianni de Carvalho Lima. -- São
Paulo, 2005.
92p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Microbiologia de alimentos 2. Ciência dos alimentos I.
T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

664.07 CDD

Kátia Gianni de Carvalho Lima

Otimização das condições de cultivo laboratorial de bactérias lácticas e probióticas e avaliação do comportamento de *Lactobacillus casei* no trato gastrintestinal através de modelos simulados *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientadora/presidente

Flavio Altissimi
1º. examinador

Maíza Landgraf
2º. examinador

Szilvika Moreno
3º. examinador

Jacques Robert Nicolli
4º. examinador

São Paulo, 12 de abril de 2005.

*A Deus, pelo dom da vida e por todo cuidado,
Aos meus pais, Gerson e Laini, pela estrutura, amor e afeto,
Ao meu irmão, Gerson, pelo incentivo e carinho,
Ao meu esposo, Ricardo, pelo companheirismo e dedicação,
À minha Nona (in memorian), pelo exemplo de vida.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Bernadette D. G. M. Franco, pela orientação, dedicação, por todo seu incentivo, confiança, carinho e apoio.

Às Prof^{as}. Dra. Maria Teresa Destro e Mariza Landgraf pelas importantes dicas e pelo convívio agradável durante estes anos de trabalho.

À Monika Francisca Kruger, pela ajuda nos experimentos, discussões e análise de resultados, mas principalmente pela amizade.

À Kátia e Lúcia, pelo preparo de materiais e organização do laboratório, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório: Alcina, Ângela, Antônio, Cecília, Cíntia, Cristina Cruz, Cristina Garcia, Cristiano, Eb, Gabriela, Gunnar, Hans, Janine, Lina, Paulo, Patrícia Bettini, Patrícia Kary, Ricardo, Susana, Tatiana, Vanessa Tsu, Vanessa Vieira e Vinícius, que tornaram a ida ao laboratório muito mais prazerosa.

Ao Jorge Behrens, pela análise estatística do trabalho.

Às secretárias Tânia e Mônica, pela colaboração e ajuda nos momentos necessários.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Elaine e Jorge, pela paciência e disposição.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

À Chr. Hansen S/A e Yakult S/A Indústria e Comércio pelo fornecimento das cepas.

À Cibele, pelo apoio espiritual e orações, palavras de ânimo nas horas mais difíceis, carinho e amizade sincera.

Aos meus amigos Claudia, Eduardo, Eunice, Maria Toledo e Sidney, pela amizade e apoio.

À minha família, pelo eterno carinho e incentivo em todos os passos da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2. 1. Alimentos funcionais probióticos	03
2. 2. Culturas probióticas	08
2. 2. 1. Enumeração de bactérias probióticas	13
2. 3. Trato gastrointestinal	16
2. 3. 1. Microbiota intestinal	21
2. 3. 2. Alteração da microbiota intestinal	22
2.4. Resistência de culturas lácticas e probióticas aos sucos gástrico e entérico	23
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4. 1. Avaliação das condições para o cultivo de culturas lácticas e probióticas	29
4. 1. 1. Culturas	29
4. 1. 2. Meios de cultura	30
4. 1. 3. Análise microbiológica qualitativa	34
4. 1. 4. Análise microbiológica quantitativa	34

4. 2. Avaliação da resistência das culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados	36
4. 2. 1. Culturas probióticas empregadas	36
4. 2. 2. Avaliação da resistência de culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados	36
4. 2. 3. Avaliação do efeito protetor do leite na resistência de culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados	40
4. 2. 4. Avaliação da resistência de culturas probióticas à pepsina, bile e pancreatina	40
4. 3. Tratamento de dados e análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5. 1. Otimização do cultivo diferencial <i>in vitro</i>	42
5. 1. 1. Avaliação microbiológica qualitativa	42
5. 1. 2. Avaliação microbiológica quantitativa	45
5. 1. 2. 1. Avaliação microbiológica quantitativa de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12	45
5. 1. 2. 1. 1. Influência dos componentes do meio de cultura	48
5. 1. 2. 1. 2. Influência da forma de semeadura	48
5. 1. 2. 1. 3. Influência da temperatura de incubação	49
5. 1. 2. 2. Avaliação microbiológica quantitativa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La05	49
5. 1. 2. 2. 1. Influência dos componentes do meio de cultura	52
5. 1. 2. 2. 2. Influência da forma de semeadura	52

5. 1. 2. 2. 3. Influência da temperatura de incubação	53
5. 1. 2. 3. Avaliação microbiológica quantitativa de <i>Lactobacillus casei</i>	53
Lc01	
5. 1. 2. 3. 1. Influência dos componentes do meio de cultura	56
5. 1. 2. 3. 2. Influência da forma de semeadura	56
5. 1. 2. 3. 3. Influência da temperatura de incubação	57
5. 1. 2. 4. Avaliação microbiológica quantitativa de <i>Lactobacillus casei</i>	57
Shirota	
5. 1. 2. 4. 1. Influência dos componentes do meio de cultura	60
5. 1. 2. 4. 2. Influência da forma de semeadura	60
5. 1. 2. 4. 3. Influência da temperatura de incubação	61
5. 2. Avaliação da sobrevivência de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota e	62
<i>Lactobacillus casei</i> Lc01 no trato gastrintestinal	
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparelho digestivo.	17
Figura 2. Glândula oxíntica.	19
Figura 3. Contagens de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em anaerobiose.	47
Figura 4. Contagens de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La05 (log UFC/mL) em 3 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose.	51
Figura 5. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Lc01 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose.	55
Figura 6. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose.	59
Figura 7. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por até 120min.	63
Figura 8. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por até 120min.	63
Figura 9. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min.	64

- Figura 10.** Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min. 64
- Figura 11.** Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por até 120min. 70
- Figura 12.** Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por até 120min. 70
- Figura 13.** Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min. 71
- Figura 14.** Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais produtos alimentícios contendo bactérias probióticas comercializados no Brasil em 2004.	06
Tabela 2. Composição do meio LC (SHAH, 2000).	33
Tabela 3. Crescimento de culturas lácticas e probióticas semeadas por esgotamento na superfície de diferentes meios de cultura e condições de cultivo.	44
Tabela 4. Contagens de <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).	46
Tabela 5. Contagens de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La05 (log UFC/mL) em 3 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).	50
Tabela 6. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Lc01 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).	54
Tabela 7. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).	58
Tabela 8. Contagens de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota e <i>Lactobacillus casei</i> Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado (pH 3) contendo ou não pepsina (3g/L).	67

Tabela 9. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco entérico simulado (pH 8) contendo ou não bile (10g/L) e pancreatina (1g/L). 68

RESUMO

Os efeitos benéficos que as bactérias probióticas proporcionam à saúde humana dependem de sua quantidade e atividade biológica no intestino humano. Esse trabalho objetivou estabelecer as melhores condições laboratoriais para o cultivo e enumeração diferencial de cinco culturas de bactérias, sendo três probióticas (*Bifidobacterium animalis* Bb12, *Lactobacillus acidophilus* La05, *Lactobacillus casei* Lc01) e duas lácticas não probióticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). O trabalho objetivou também avaliar a capacidade de duas linhagens de bactérias probióticas de *Lactobacillus casei* (Shirota e Lc01) sobreviverem ao trânsito pelo trato gastrointestinal humano (TGI), empregando modelos simulados *in vitro*. Foram testados vinte e um meios de cultura diferentes, semeados em superfície e em profundidade, e incubados a 37°C e a 42°C, em condições de aerobiose e anaerobiose. Para a avaliação da resistência ao TGI, empregou-se modelos simulados constituídos de solução de NaCl estéril (0,5% p/v) contendo pepsina (3g/L), com pH 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 (suco gástrico) e solução de NaCl estéril (0,5% p/v) contendo pancreatina (1g/L) e bile (10g/L), com pH 8,0 (suco entérico). As culturas foram expostas ao suco gástrico por até 120min, e em seguida ao suco entérico por até 240min. Os resultados indicaram que a suplementação do ágar MRS com diferentes compostos e o uso de combinações apropriadas de forma de semeadura e condições de incubação permitem tornar o ágar MRS um meio seletivo e diferencial para as diferentes espécies testadas. Em função dos resultados da avaliação dos meios de

cultura, selecionou-se o ágar MRS pH 5,4 com semeadura em profundidade e incubação a 37°C em aerobiose para avaliar a resistência de *L. casei* (Shirota e Lc01) ao TGI. Os resultados revelaram que, após a exposição por 30min ao suco gástrico com pH 1,5 e 2,0, as duas linhagens de *L. casei* não eram mais cultiváveis. Em pH 2,5, houve redução de 4 ciclos log após 2h e, em pH 3,0, não houve modificação no número de células viáveis. A transferência para o suco entérico resultou na reversão parcial da injúria causada pelo suco gástrico extremamente ácido. Além disso, foi demonstrado que o leite pode proteger as bactérias do estresse decorrente da passagem pelo TGI.

Palavras-chave: probióticos, bactérias lácticas, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, trato gastrintestinal.

ABSTRACT

The beneficial effects of probiotic bacteria to the human health depend on their quantity and biological activity in the human gut. This study aimed to establish the best laboratorial conditions for the differential cultivation and enumeration of five bacterial cultures, including three probiotic (*Bifidobacterium animalis* Bb12, *Lactobacillus acidophilus* La05 and *Lactobacillus casei* Lc01) and two non-probiotic (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) strains. In addition, this study also aimed to evaluate the capability of two probiotic strains (*Lactobacillus casei* Shirota and Lc01) to survive the transit through the human gastrointestinal tract, using *in vitro* simulated models. Twenty one different culture media were tested. They were inoculated using pour-plating and spread-plating techniques. Plates were incubated at 37°C and 42°C, under aerobiosis and anaerobiosis. Resistance to the gastrointestinal tract was tested using simulated models, constituted by 0.5% saline containing pepsin (3g/L) at pH 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 (gastric juice) and by 0.5% saline containing pancreatin (1g/L) and bile (10g/L) at pH 8.0 (enteric juice). The cultures were exposed to gastric juice (up to 120min) and then to enteric juice (up to 240min). Results indicated that supplementation of MRS agar with certain compounds and use of appropriate combinations of plating procedures and incubation conditions can turn MRS agar a selective and differential medium for the tested species. The combination MRS agar at pH 5,4, pour-plating and incubation at 37°C under aerobiosis was selected for evaluation of resistance of the *L. casei* (Shirota e Lc01) to the gastrointestinal tract. Results indicated that

both cultures became non-culturable after 30min exposure to the gastric juice at pH 1.5 and 2.0. After 2h at pH 2.5, a 4 log reduction was observed. At pH 3.0, no change in the number of viable cells was detected. The subsequent transfer to the enteric juice caused a partial reversion in injury induced by the acid pH. In addition, it was observed that milk can protect the probiotic bacteria from the stress caused by the transit through the gastrointestinal tract.

Key words: probiotics, lactic acid bacteria, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, gastrointestinal tract.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma grande preocupação por parte da população em consumir alimentos mais saudáveis, que, além de fornecerem os nutrientes necessários, tragam benefícios à saúde. Esses alimentos recebem atualmente a denominação de alimentos funcionais. Os alimentos probióticos fazem parte desta categoria de produtos, pois estão associados à saúde e ao bem estar das pessoas (MONTALTO *et al.*, 2002; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; MARTIN *et al.*, 2005; SARTOR, 2005; SULLIVAN *et al.*, 2005).

O consumo de alimentos probióticos tem aumentado muito nos últimos anos em diversos países da Europa, nos E.U.A. e também no Brasil. Na Europa, a diversidade de alimentos probióticos é bem grande, incluindo leites, iogurtes, bebidas lácteas e queijos (DALY *et al.*, 1998; SANDERS, 1999; CHOW, 2002; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; COEURET *et al.*, 2004 a e b; DRAGO *et al.*, 2004). No Brasil, este mercado iniciou-se com leites fermentados e iogurtes, mas atualmente há outros novos alimentos probióticos em estudo, como queijos, sobremesas lácteas, leite de soja, entre outros (BEHRENS *et al.*, 2004).

Alimentos probióticos são alimentos que contêm microrganismos probióticos vivos, que podem ser aqueles responsáveis pela fermentação do produto, ou que simplesmente são adicionados, não influenciando suas características sensoriais. As bactérias probióticas mais freqüentemente utilizadas em alimentos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*,

Lactobacillus rhamnosus GG e *Bifidobacterium* sp. (BORRIELO *et al.*, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2003; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003).

Um dos pré-requisitos para o efeito benéfico dos probióticos na saúde humana é que esses microrganismos sobrevivam aos mecanismos de defesa naturais do trato gastrointestinal, como o pH ácido do estômago, as enzimas gástricas e do intestino delgado e o movimento peristáltico (MARTEAU *et al.*, 1997; FERNANDEZ *et al.*, 2003; NORIEGA *et al.*, 2004; TOMAS *et al.*, 2004; ZARATE *et al.*, 2004).

A capacidade de sobrevivência dos microrganismos probióticos nos alimentos e sob condições de estresse impostas pelo trato gastrointestinal ainda é pouco estudada. Para que esses estudos possam ser desenvolvidos, também é necessário aprofundar os conhecimentos sobre a eficiência de metodologias para cultivo e enumeração dessas bactérias probióticas na presença de outras bactérias presentes no alimento em estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. Alimentos funcionais probióticos

Há muito tempo sabe-se que determinados tipos de alimentos apresentam alguns efeitos benéficos especiais sobre a saúde humana e também em animais. Apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados alimentos funcionais e de seus componentes responsáveis por esses efeitos, tornou-se intenso apenas nos últimos anos.

Hoje se consideram alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, melhoram a saúde através mecanismos não existentes na nutrição convencional. Deve-se salientar que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1999; MONTALTO *et al.*, 2002; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; MARTIN *et al.*, 2005; SATOR, 2005; SULLIVAN e NORD, 2005; SULLIVAN *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o estudo de alimentos funcionais concentrou-se principalmente nos alimentos probióticos, devido ao seu evidente efeito benéfico sobre a microbiota intestinal, e conseqüentemente, sobre o funcionamento do trato gastrintestinal humano (SALMINEN *et al.*, 1998; ZIEMER e GIBSON, 1998; ROBERFROID, 2000; SAARELA *et al.*, 2000; MARTEAU *et al.*, 2001; CHOW, 2002; NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 2003). Como conseqüência, observa-se um aumento constante no desenvolvimento de novos produtos lácteos fermentados.

No Brasil, a legislação referente aos alimentos funcionais é relativamente recente (BRASIL, 1999 a, b, c, d). A Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos, recomendou que um alimento funcional probiótico deve apresentar uma concentração mínima de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias de cultura probiótica por grama de produto (UFC/g) durante o seu prazo de validade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005). Assim, para que um novo produto seja considerado probiótico, é necessário garantir que essa concentração de microrganismos viáveis esteja presente ao longo de toda sua vida-de-prateleira.

Diversas indústrias de alimentos desenvolveram e licenciaram suas próprias bactérias probióticas. Como exemplos podemos citar *Lactobacillus johnsonii*, da Nestlé, *Lactobacillus rhamnosus* GG da Batavia e *Lactobacillus casei* Shirota da Yakult (DALY *et al.*, 1998).

Em 1998, DALY *et al.* estimaram que cerca de 13% do total de iogurtes vendidos na Europa continham culturas probióticas e que este mercado era da ordem de 889 milhões de dólares. Na época, o mercado francês era considerado o maior, atingindo cerca de 219 milhões de dólares (STANTON *et al.*, 2001).

Levantamento feito por SHAH em 2000 indicou cerca de 70 produtos lácteos diferentes contendo culturas probióticas no mercado mundial. Somente no Japão havia pelo menos 53 tipos de produtos lácteos. Entre esses produtos, predominavam os leites fermentados, manteiga, iogurte, queijos, leite em pó e sobremesas.

Em relação Brasil, os alimentos probióticos são principalmente leites fermentados, iogurtes e sobremesas lácteas (Tabela 1). Sabe-se que em 2000, o consumo estimado de alimentos probióticos foi da ordem de 120 mil ton/ano (FOOD INGREDIENTS, 2000), sendo esse consumo crescente devido aos recentes lançamentos de novos alimentos contendo culturas probióticas.

Tabela 1. Principais produtos alimentícios contendo bactérias probióticas comercializados no Brasil em 2004.

Categoria do Produto	Produto	Produtor	Bactérias
Leite Fermentado	Yakult	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
	Chamyto	Nestlé	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	LC1 Active	Nestlé	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Leite Fermentado Parmalat	Parmalat	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Vigor Club	Vigor	<i>Lactobacillus casei</i>
	Leite Fermentado Paulista	Paulista	<i>Lactobacillus casei</i>
	Batavito	Batavo	<i>Lactobacillus casei</i>
Leite Fermentado Aromatizado	Batavito maçã tutti-frutti	Batavo	<i>Lactobacillus casei</i>
	Chamyto morango maracujá tutti-frutti tangerina	Nestlé	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	LC1 Active morango	Nestlé	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Vigor Club abacaxi maçã	Vigor	<i>Lactobacillus casei</i>
logurte	Biofibras	Batavo	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Sobremesa láctea	Sofyl	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
	Activia	Danone	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
Leite em pó	Nam	Nestlé	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>

Muitos microrganismos probióticos não se multiplicam bem no leite e não sobrevivem bem no produto final, além de freqüentemente conferirem ao produto um sabor diferente do leite fermentado tradicional (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para o processamento de laticínios contendo microrganismos probióticos que possam contornar esses inconvenientes, controlando variáveis como tamanho do inóculo, condições de incubação, interação entre os microrganismos presentes no produto, sobrevivência das culturas durante o armazenamento, bem como atendimento da legislação vigente. Somente com essas informações será possível a obtenção de produtos lácteos probióticos com boas propriedades sensoriais e concentração adequada de bactérias viáveis. O uso combinado de culturas “starter” comerciais e culturas probióticas pode ser conveniente, mas sua compatibilidade deve ser verificada (SVENSSON, 1999).

Embora muitas pesquisas tenham sido realizadas com diferentes alimentos contendo culturas lácticas, principalmente com leites fermentados e iogurtes, esses produtos nem sempre são probióticos, pois podem não ser adequados para que o número de células viáveis das culturas probióticas se mantenha suficientemente elevado (GARDINER *et al.*, 1999 a e b). Além disso, outros alimentos podem apresentar potencial para a adição dessas culturas, como o sorvete de iogurte (DAVIDSON *et al.*, 2000), produtos nutritivos em pó (INGHAM, 1999), leite de soja (SHIMAKAWA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; BEHRENS *et al.*, 2004), e queijos (DINAKAR e MISTRY, 1994; BLANCHETTE *et al.*, 1996; GOBBETTI *et al.*, 1997; ROY *et al.*, 1997; GOMES e MALCATA,

1998; STANTON *et al.*, 1998; GARDINER *et al.*, 1999 a e b; VINDEROLA *et al.*, 2000).

A avaliação de diferentes tipos de queijo mostram que podem ser apropriados para veicular culturas probióticas de *Lactobacillus* sp. e de *Bifidobacterium* sp., destacando-se os queijos Cheddar (DINAKAR e MISTRY, 1994; GARDINER *et al.*, 1999 a), Gouda (GOMES e MALCATA, 1998), Cottage (BLANCHETTE *et al.*, 1996), Crescenza (GOBBETTI *et al.*, 1997) e fresco (ROY *et al.*, 1997; VINDEROLA *et al.*, 2000).

2. 2. Culturas probióticas

Culturas probióticas são definidas como microrganismos viáveis (bactérias lácticas e outras bactérias ou leveduras), usados na forma de células desidratadas ou não, que, quando ingeridas em número suficiente, apresentam efeito benéfico para a saúde do hospedeiro (FULLER, 1989; GUARNER e SCHAAFSMA, 1998; GOMES e MALCATA, 1999). O conceito “probiótico” foi desenvolvido no início do século XX pelo cientista russo Elie Metchnikoff (prêmio Nobel), que atribuiu à vida saudável e longa de camponeses búlgaros ao consumo de produtos lácteos fermentados. Ele acreditava que os bacilos fermentadores (*Lactobacillus*) ingeridos com esses produtos influenciavam positivamente a microbiota do intestino, diminuindo suas atividades tóxicas (SANDERS, 1999).

Segundo FULLER (1989) e NAIDU e CLEMENS (2000), as culturas probióticas agem benéficamente no organismo porque causam a diminuição do

número de células viáveis de microrganismos patogênicos, pela produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e sítios de adesão e da influência no metabolismo microbiano através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. Além disso, as culturas probióticas atuam estimulando a imunidade do hospedeiro, com aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos. Diversos autores vêm descrevendo inúmeros outros possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro, como controle das infecções intestinais, estímulo da mobilidade intestinal com conseqüente alívio da constipação intestinal, melhor absorção de determinados nutrientes, melhor utilização de lactose e alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, diminuição dos níveis de colesterol, atividade anticarcinogênica, além da exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (KIM e GILLILAND, 1983; FULLER, 1989; GILLILAND, 1989; GOMES e MALCATA, 1999; LEE *et al.*, 1999; TEJADA-SIMON *et al.*, 1999; NAIDU e CLEMENS, 2000; SAARELA *et al.*, 2000; SREEKUMAR e HOSONO, 2000; ISOLAURI, 2001; CHOW, 2002; REID e BURTON, 2002; COEURET *et al.*, 2004 b; MARTEAU *et al.*, 2004; VANDERHOOF e YOUNG, 2004; REID, 2005; SULLIVAN e NORD, 2005).

Segundo GOMES e MALCATA (1999), os resultados desses estudos são bastante variáveis, chegando a ser contraditórios em alguns casos, concluindo-se que algumas propriedades benéficas atribuídas às culturas probióticas necessitam de estudos mais controlados para serem definitivamente estabelecidas.

A escassez de estudos científicos clínicos conclusivos induziu a criação, em 1996, do projeto PROBDEMO – “Demonstration of the Nutritional Functionality of Probiotic Foods”, envolvendo universidades, centros de pesquisa e indústrias de toda a Europa. A principal meta era demonstrar a influência dos probióticos sobre a microbiota intestinal e a saúde humana, empregando-se estudos clínicos pilotos controlados. O alvo era tanto indivíduos saudáveis quanto aqueles com problemas de saúde, para os quais o tratamento com probióticos apresentava um bom potencial tanto profilático quanto terapêutico. Os resultados desse projeto comprovaram que alguns probióticos podem influenciar a composição da microbiota intestinal e modular o sistema imunológico do hospedeiro, resultando em efeitos benéficos mensuráveis sobre a sua saúde. O emprego de probióticos selecionados mostrou-se bastante promissor no controle de doenças intestinais inflamatórias e de infecções em crianças e idosos (MATTILA-SANDHOLM, 1999; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1999).

Segundo LEE *et al.* (1999), a maioria das culturas empregadas como probióticos é comensal do intestino humano. Dentre esses microrganismos, os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são reconhecidos como seguros e, são classificados pelo FDA (Food and Drug Administration – E.U.A.) como GRAS (“Generally Recognized As Safe”), podendo ser empregados em alimentos.

Entre os microrganismos probióticos, os mais importantes pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L.*

johnsonii, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*) (LEE *et al.*, 1999). Culturas probióticas comerciais podem ser constituídas por um único microrganismo ou uma mistura de vários microrganismos, sendo *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. os mais usados (SAARELA *et al.*, 2000; ACHARYA e SHAH, 2002).

Para que um microrganismo possa ser considerado um probiótico, ele deve ser um componente normal da microbiota humana, não ser patogênico, não estar associado a doenças e ser seguro para o uso em humanos. Além de estimular a resposta imune, espera-se que um microrganismo probiótico tenha atividade antimicrobiana contra patógenos, como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile* (DRAGO *et al.*, 1997; GANZLE *et al.*, 1999; GOMES e MALCATA, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; DUNNE *et al.*, 2001; NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 2003).

Segundo REID (1999), microrganismos probióticos devem apresentar ainda outras propriedades importantes, tais como: ser capazes de aderir às células da mucosa intestinal; inibir ou reduzir a adesão de microrganismos patogênicos à mucosa intestinal; sobreviver e multiplicar no trato gastrintestinal; não ser invasivos, carcinogênicos ou patogênicos e manter um equilíbrio com a microbiota normal.

O efeito benéfico das culturas probióticas para o hospedeiro é dependente da concentração das células metabolicamente ativas que chegam ao intestino. Para que esse efeito benéfico possa ocorrer é necessário que as culturas probióticas estejam presentes nos alimentos em concentração superior a 10^6 - 10^7 UFC por grama de produto ingerido (FULLER, 1989; LEE e

SALMINEN, 1995; DALY e DAVIS, 1998; SAARELA *et al.*, 2000; SHAH, 2000). Verifica-se, no entanto, que o atendimento desse requisito nem sempre é observado nos alimentos ditos probióticos porque a concentração de células tende a diminuir com a estocagem, independente do controle da temperatura.

Diversos fatores podem afetar a viabilidade dos microrganismos probióticos em produtos lácteos fermentados, entre os quais se destacam: a linhagem empregada, a interação entre as espécies presentes, as condições de cultivo, a produção de peróxido de hidrogênio, a acidez final do produto, a concentração de ácido láctico e acético, e a presença de fatores protetores do leite (GILLILIAND e SPECK, 1977; KLAVER *et al.*, 1993; SAMONA e ROBINSON, 1994; RYBKA e KAILASAPATHY, 1995; LANKAPUTHRA e SHAH, 1996; SHAH e LANKAPUTHRA, 1997; SHAH, 2000; VINDEROLA *et al.*, 2000; NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 2001).

Em uma pesquisa realizada por FANTAZZINI *et al.* (2000), observou-se uma grande variação na contagem dos microrganismos probióticos em amostras de leite fermentado pertencentes a quatro marcas diferentes adquiridos no comércio de São Paulo ainda dentro do prazo de validade. As contagens de bactérias lácticas nas amostras estudadas variaram de 5,7 log UFC/mL até 8,4 log UFC/mL, ou seja, uma variação de até 2,7 log UFC/mL. TRINDADE (2001) também demonstrou que estocagem a 7°C causava uma drástica redução na contagem de *Bifidobacterium lactis* em iogurte com pH 4,2, após 28 dias.

2. 2. 1. Enumeração de bactérias probióticas

Qualquer estudo sobre viabilidade de bactérias probióticas é dependente do uso de metodologia laboratorial adequada para sua enumeração. A literatura indica que não há unanimidade quanto ao melhor procedimento experimental para enumeração das diferentes linhagens de bactérias probióticas. Tradicionalmente, a contagem de bactérias lácticas é realizada em ágar MRS, incubado a 30°C por 48h em anaerobiose, mas esse meio nem sempre é o mais adequado para todas as espécies (PAYNE *et al.*, 1999; VINDEROLA e REINHEIMER, 1999 e 2000; ROY, 2001).

Para enumerar culturas lácticas presentes em alimentos, o meio de cultura, a temperatura, o tempo e a atmosfera de incubação devem ser especialmente ajustados para obtenção de colônias características (VINDEROLA e REINHEIMER, 2000). A escolha do meio de cultura para enumeração de bactérias probióticas em produtos lácteos depende de certas características dessas bactérias, como tolerância ao oxigênio, necessidades nutricionais e susceptibilidade a antibióticos, bem como do tipo de produto a ser analisado e da microbiota presente (IDF, 1995; CHARTERIS *et al.*, 1998 a). Em produtos que contenham apenas uma espécie de cultura láctica ou probiótica, a detecção pode ser simples, mas quando existem combinações de gêneros e espécies, podem ocorrer complicações, pois em um mesmo meio de cultura podem crescer diferentes bactérias lácticas (IDF, 1995).

Em produtos lácteos contendo mistura de bactérias probióticas, como é o caso de alguns leites fermentados comerciais, existe a necessidade de

emprego de meios seletivos e diferenciais, que permitem não apenas a contagem, mas também a diferenciação das diferentes espécies probióticas presentes nesses produtos (DAVE e SHAH, 1996).

Para enumeração de bactérias probióticas em produtos contendo também *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* utiliza-se meios contendo sais biliares, que inibem o crescimento dos microrganismos não adaptados ao ambiente intestinal. VINDEROLA e REINHEIMER (1999) verificaram que bifidobactérias, *L. casei* e *L. acidophilus* crescem bem ágar MRS contendo 1% de oxgall, enquanto a adição de cloreto de lítio ou propionato de sódio inibiu o crescimento de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, sem interferir no crescimento de bifidobactérias e *L. casei*.

A adição de antibióticos também pode tornar o meio de cultura seletivo para determinada espécie. INGHAM (1999) observou que em ágar contendo dicloxacilina houve crescimento de bifidobactérias e de *Lactobacillus reuteri* e inibição de *L. acidophilus*. Segundo LIM *et al.* (1995), a adição de gentamicina permite o desenvolvimento de bifidobactérias, inibe parcialmente o crescimento de algumas linhagens de *L. acidophilus* e *L. casei* e inibe completamente o crescimento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, podendo assim ser utilizado como um meio seletivo para bifidobactérias.

A presença de uma única fonte de carbono no meio de cultura, que seja fermentável apenas pela bactéria probiótica em estudo, também tem sido utilizada para evitar o crescimento da microbiota acompanhante. VINDEROLA e REINHEIMER (1999) verificaram que a substituição da glicose do ágar MRS por

trealose inibia o crescimento de bactérias lácticas e bifidobactérias que não possuem a capacidade de assimilar este carboidrato. Os autores ainda observaram que a substituição da glicose do ágar MRS por maltose inibia o crescimento das bactérias do iogurte *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, enquanto o crescimento de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. não era afetado.

A adição de cisteína ao ágar MRS foi recomendada por SHAH (2000) para o cultivo de bifidobactérias, devido à diminuição do potencial de oxido-redução e criação de uma condição de microaerofilia, favorecendo o crescimento desse microrganismo.

Em produtos contendo culturas probióticas juntamente com as bactérias lácticas observou-se que, além da ação dos componentes presentes no meio, a elevação da temperatura de incubação para 42°C também inibe o crescimento das bactérias mesófilas, cuja temperatura máxima de multiplicação é de 40°C (IDF, 1995).

Para o isolamento de *Lactobacillus* em produtos contendo também bifidobactérias, a incubação deve feita em aerobiose, o que evita crescimento de bifidobactérias, que são anaeróbias estritas (IDF, 1995).

Segundo IDF (1995), o ágar MRS, utilizado para cultivo de bactérias lácticas, entre elas *L. acidophilus* e *L. casei*, como cultura pura ou em combinação com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* ou bifidobactérias, não permite a distinção entre essas bactérias, pois o meio não é seletivo. Já os ágares Maltose-MRS, Trealose-MRS e LC podem ser utilizados para cultivo de *L. acidophilus* e *L. casei*, como cultura pura ou em combinação

com *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e bifidobactérias, pois *L. acidophilus* e *L. casei* são capazes de fermentar maltose e trealose, enquanto as demais não são. Nesses meios, *L. acidophilus* e *L. casei* podem ser diferenciadas entre si pelo tamanho de suas colônias (PEDERSEN, 1993; IDF, 1995; SHAH, 2000). Segundo SHAH (2000), o ágar LC permite apenas o crescimento de *L. casei*.

Além da composição do meio de cultura a ser utilizado, o crescimento das diferentes culturas probióticas depende de outros fatores, como temperatura e atmosfera de incubação, e forma de semeadura. Segundo ROY (2001), a técnica de semeadura em profundidade é mais eficiente que a de semeadura em superfície para o cultivo de bifidobactérias porque esses microrganismos requerem condições de anaerobiose para seu crescimento.

2. 3. Trato gastrintestinal humano

O trato gastrintestinal humano é um tubo que se estende da boca até o ânus, medindo cerca de 9 metros no adulto. A cavidade bucal e o esôfago medem, juntos, 40cm e esta porção está situada acima do diafragma e do estômago. O restante do trato gastrintestinal, o estômago, intestino delgado e intestino grosso se concentram no abdômen (Figura 1).

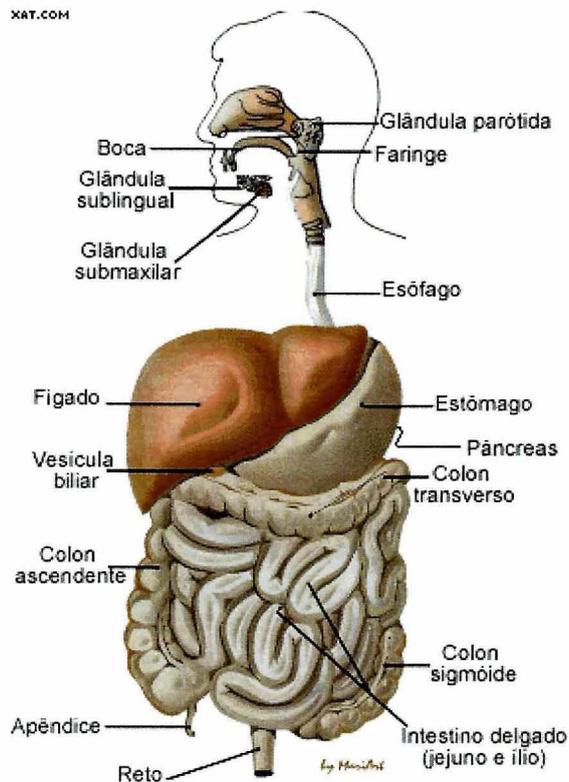


Figura 1. Aparelho digestivo (www.drgate.com.br/.../digestivo/digestivo.htm)

O estômago é um órgão musculoso, dividido em fundo, antro e corpo, e tem um volume interno de 30mL em recém-nascidos e 1,2-1,4L em adultos. A ligação entre o esôfago e o estômago é feita pela válvula cárdia, e a ligação entre o estômago e o duodeno é feita pela válvula pilórica (MITSUOKA, 1978; GUYTON e HALL, 2002; MERCIER *et al.*, 2002; VANDAMME *et al.*, 2002)

A mucosa gástrica é coberta por muitas glândulas gástricas, responsáveis pela secreção de enzimas e ácido clorídrico. As glândulas gástricas são divididas em mucosas, oxínticas e pilóricas (GUYTON e HALL, 2002).

As células mucosas presentes nas glândulas mucosas são responsáveis pela produção de um muco viscoso e insolúvel, responsável pela lubrificação, protegendo a parede do estômago da secreção proteolítica e ácida.

As glândulas oxínticas (Figura 2) são formadas por células cervicais mucosas, pépticas e oxínticas, também chamadas de parietais, e são responsáveis pela secreção de ácido, enzimas e muco. Quando estimuladas, as células parietais secretam uma solução ácida com 160mM de HCl (concentração até 3 milhões de vezes superior à do sangue) com valor de pH em torno de 0,8. As células pépticas e mucosas secretam o pepsinogênio, que é ativado pelo ácido clorídrico, formando a pepsina. A pepsina é mais ativa em pH ácido (1,8 a 3,5), e em valores de pH acima de 5,0, tem baixa atividade proteolítica. As células mucosas das glândulas oxínticas são responsáveis pela secreção de muco. Além da secreção de pepsina pelas glândulas oxínticas, ocorre a secreção de outras enzimas como lipase gástrica, amilase gástrica, gelatinase, e fator intrínseco, responsável pela absorção da vitamina B12 (GUYTON e HALL, 2002).

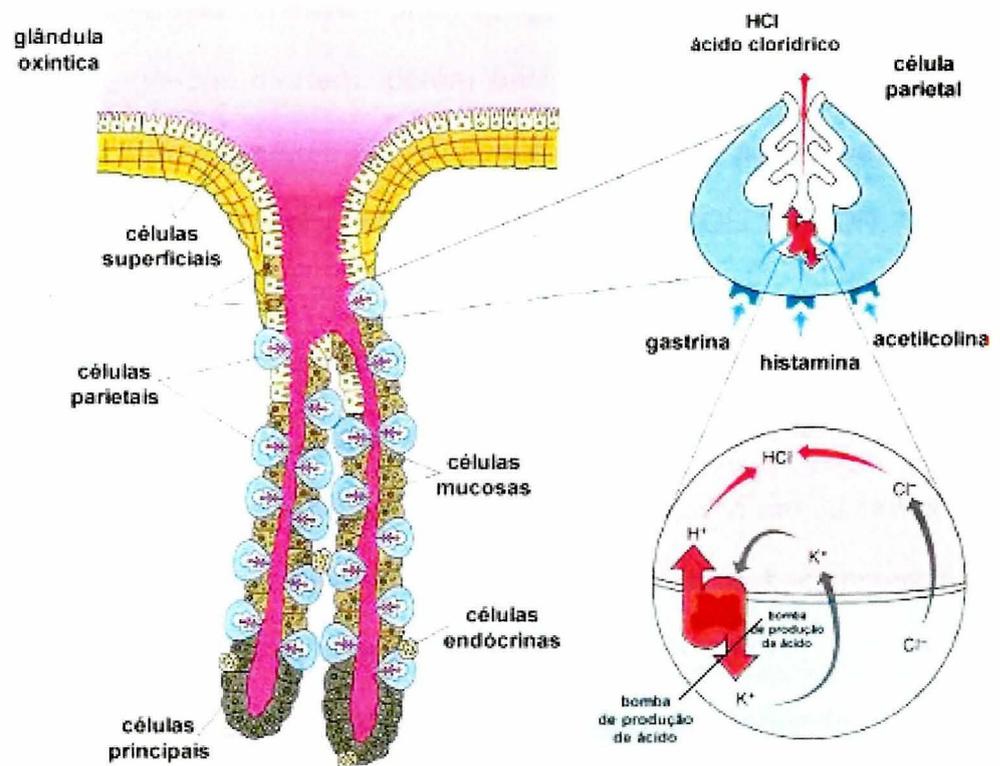


Figura 2. Glândula oxíntica (www.rede-nonio.min-edu.pt).

As glândulas pilóricas são formadas por células mucosas, G e pépticas, responsáveis pela secreção de muco, gastrina (que estimula a produção de HCl) e pepsinogênio, respectivamente.

Humanos secretam de 2 a 3L de suco gástrico por dia, sendo este suco constituído de ácido clorídrico, enzimas e muco. O valor de pH no estômago varia ao longo do dia, em função da ingestão de alimentos. Quando vazio, o estômago tem valores de pH em torno de 1-2, porém após uma refeição, este valor pode chegar a 5-6. Com a secreção de suco gástrico, o pH do estômago vai gradualmente caindo para 1-3, até o alimento entrar no intestino delgado.

Devido a essa acidez, que constitui a primeira barreira contra microorganismos, muitas bactérias ingeridas morrem, porém bactérias ácido-resistentes, como *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. são capazes de sobreviver (MITSUOKA, 1978; NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 1998; GUYTON e HALL, 2002).

Segundo BERRADA *et al.* (1991), quando o suco gástrico é secretado, o pH é aproximadamente 2,0 e a quantidade de sal é inferior a 0,5%. Esses mesmos autores afirmaram que 80% do estômago é esvaziado em 90 minutos, e a passagem de alimentos pelo estômago, depende da sua composição, principalmente da quantidade de gordura presente.

Após a passagem pelo estômago, o alimento é conduzido para o intestino delgado, órgão que mede 5m de comprimento por 3cm de diâmetro, e dividido em duodeno, jejuno e íleo. O duodeno recebe os sucos biliar e pancreático, provenientes da vesícula biliar e do pâncreas, respectivamente. O suco biliar é responsável pela digestão de lipídios e o pancreático pela digestão de lipídios, proteínas e açúcares. Estas secreções constituem a segunda barreira contra bactérias, sendo que no duodeno poucas espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus* conseguem sobreviver. O número de bactérias volta a aumentar no jejuno e no íleo, devido à neutralização do suco gástrico pelos sucos biliar e pancreático e à passagem mais lenta neste órgão (MITSUOKA, 1978; NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 1998 e 1999; GUYTON e HALL, 2002).

A parede do intestino delgado é coberta pelas vilosidades, cuja função é aumentar a área de absorção dos nutrientes. Estas vilosidades ainda são

constituídas por microvilosidades, que têm uma estrutura chamada glicocálix, composta de glicoproteínas e mucopolissacarídeos, conferindo às vilosidades uma carga negativa, que tem um papel importante na fixação de bactérias à mucosa intestinal.

O intestino delgado liga-se ao intestino grosso através da válvula íleo cecal. O intestino grosso é um tubo extremamente elástico, medindo 1,5m de comprimento e 5cm de diâmetro, em média. A parte inicial do intestino grosso é o ceco, em seguida vêm os cólons ascendente, transverso, descendente e sigmóide, então o reto e o ânus. O intestino grosso é o melhor habitat para as bactérias intestinais. No ceco, o número destas bactérias intestinais é elevado, chegando a contagens de 10^9 - 10^{11} UFC/mL, sendo que sua composição é a mesma encontrada nas fezes (NUTRITION AND HEALTH COLLECTION, 1999).

2. 3. 1. Microbiota intestinal

Cada região do trato gastrointestinal tem uma microbiota característica, mas existem variações entre as espécies bacterianas dependendo do indivíduo (MITSUOKA, 1997; TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). A contagem total de bactérias na cavidade oral de um adulto é cerca de 10^7 UFC/mL de saliva. Esse número de bactérias, ao transitar pelo trato gastrointestinal diminui no estômago devido ao contato com o suco gástrico, onde somente 10^2 a 10^3 UFC/mL são detectadas. Entretanto, este número aumenta novamente no início do intestino delgado, sendo que na porção final a concentração é de cerca de 10^3 a 10^4

UFC/mL, o que ainda é um número baixo. *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp. e *Veillonella* sp. são os gêneros mais comuns nessa porção do intestino delgado.

A contagem de bactérias no íleo terminal é mais alta do que aquela encontrada na porção inicial do intestino delgado. Na transição para o intestino grosso, há uma mistura de microrganismos do intestino delgado e do intestino grosso, como *Lactobacillus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Eubacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. A partir da válvula ileocecal, a contagem de bactérias aumenta abruptamente, alcançando níveis de 10^{11} UFC/mL ou mais. Neste local ocorre a predominância de bactérias como *Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Veillonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Fusobacterium* sp. e *Pseudomonas*.

2. 3. 2. Alteração da microbiota intestinal

Em indivíduos saudáveis, a microbiota intestinal é extremamente estável. Entretanto, fatores como patologias, drogas, alimentação inadequada, estresse, interação com outras bactérias intestinais ou produtos metabólicos podem afetar essa estabilidade. Alterações na microbiota intestinal podem levar a anormalidades no peristaltismo, gastrites, anemia, câncer e doenças imunológicas. Quando existem essas alterações, ocorre um notável aumento no número total de bactérias no intestino delgado, principalmente *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* sp. No intestino grosso, ocorre uma redução de *Bifidobacterium* sp. e aumento de *Enterobacteriaceae*,

Enterococcus sp., *Clostridium perfringens* e *Klebsiella* sp.. Dessa forma, a presença de *Bifidobacterium* sp. no intestino humano é considerada um fator positivo para a saúde do indivíduo, combatendo possíveis patógenos (MITSUOKA, 1997).

2. 4. Resistência de culturas lácticas e probióticas aos sucos gástrico e entérico

Estudos realizados *in vivo* indicam que a capacidade de sobrevivência de bactérias lácticas e bifidobactérias no trato gastrintestinal depende da linhagem (CHARTERIS *et al.*, 1998 b). *Lactobacillus casei* da linhagem Shirota, por exemplo, empregado na fabricação do mais antigo alimento probiótico (leite fermentado Yakult), tem elevada resistência ao pH ácido. NORIKATSU *et al.* (1999) demonstraram que a contagem desse microrganismo nas fezes de pessoas que ingeriram durante três dias 125mL do produto contendo 10^{10} UFC/mL foi da ordem de 10^7 UFC/g de fezes.

Em contrapartida, sabe-se que a resistência de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* ao suco gástrico e à bile é baixa (LINDWALL e FONDÉN, 1984). *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* sp. são mais resistentes, porém existem variações entre as cepas (LINDWALL e FONDÉN, 1984; SAKAI *et al.*, 1987; MODLER *et al.*, 1990; BERRADA *et al.*, 1991; POCHART *et al.*, 1992). *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., quando ingeridos em leite fermentado, sobrevivem no jejuno e no íleo, tendo sido estimada uma porcentagem de sobrevivência de 30% no intestino (ROBINS-BROWNE e

LEVINE, 1981; LINDWALL e FONDÉN, 1984; BOUHNİK *et al.*, 1992; HOVE *et al.*, 1994; HYRONIMUS *et al.*, 2000).

Essas informações sobre a capacidade de sobrevivência das bactérias probióticas nas diferentes partes do trato gastrointestinal humano devem ser analisadas com cuidado, pois a resistência das culturas às condições adversas é difícil de ser avaliada *in vitro*, devido à dificuldade de se reproduzir em laboratório as características fisiológicas do estômago e intestino, e os processos físico-químicos que aí ocorrem. Os métodos de avaliação *in vitro* geralmente empregam apenas ácido clorídrico e suco gástrico simulado, sem considerar a influência não ácida, ou seja, as enzimas da secreção gástrica durante a digestão dos alimentos.

CHARTERIS *et al.* (1998 b) realizaram estudos *in vitro* com *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., inoculando uma suspensão destes microrganismos em suco gástrico simulado constituído de solução salina, com pH ajustado para 2,0, contendo pepsina (3g/L) e NaCl (5g/L), e suco entérico simulado constituído de solução salina, com pH ajustado para 8,0, contendo pancreatina (1g/L) e NaCl (5g/L). As contagens periódicas de células viáveis mostraram que nessas condições houve perda da viabilidade da maioria das culturas avaliadas. Os autores verificaram também que a adição de proteínas do leite aumentou a tolerância dessas culturas a essas condições adversas, e que a mucina gástrica não modificou a tolerância gástrica de *Lactobacillus*, mas aumentou a de *Bifidobacterium*. Dessa forma, os autores postularam que algumas culturas de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. podem sobreviver à passagem pelo trato intestinal se forem ingeridas com produtos à base de leite.

KOS *et al.* (2000), avaliando o comportamento de *Lactobacillus acidophilus* M92 em suco gástrico simulado constituído de pepsina (3g/L) e NaCl (5g/L) em pH 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0, e em suco entérico simulado contendo pancreatina (1g/L), NaCl (5g/L) e oxgall (1,5, 2,0, 3,0 e 5,0mg/mL) a pH 8,0, verificaram que esse microrganismo sobreviveu por 2h no suco gástrico simulado a pH 2,0 e por 4h no suco entérico contendo 3,1mg/mL de oxgall. Entretanto, na presença de mucina e de proteínas do leite, essa linhagem foi capaz de tolerar pH 1,77 e 4,25g/L de oxgall, revelando efeito protetor dessas substâncias sobre esse microrganismo.

É interessante observar que nesses estudos de avaliação de culturas probióticas no trato gastrointestinal humano, em condições simuladas ou não, foram empregadas culturas laboratoriais puras, mas não aquelas contidas em alimentos (ROBINS-BROWNE e LEVINE, 1981; LINDWALL e FONDÉN, 1984; BERRADA *et al.*, 1991; POCHART *et al.*, 1992; HOVE *et al.*, 1994; CHARTERIS *et al.*, 1998 b; KOS *et al.*, 2000).

MARTEAU *et al.* (1997) empregaram um modelo dinâmico computadorizado de estômago e intestino delgado para avaliar a sobrevivência de *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* nesses ambientes e para mensurar a influência das secreções gástricas sob condições fisiológicas (peristaltismo, mudanças no pH, mudanças nas concentrações de enzimas e bile), comparando os resultados com dados obtidos em humanos. Não foram observadas diferenças entre os dados *in vitro* e *in vivo*, indicando que o modelo para avaliação da influência exercida pelo trato gastrointestinal em probióticos foi adequado. Segundo os mesmos autores,

S. thermophilus e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentaram sobrevivência total no compartimento gástrico nos primeiros 20min, porém sua viabilidade diminuiu significativamente após 40min, quando comparados com *L. acidophilus* e *B. bifidum*, para os quais a sobrevivência após 180min foi de 64% e 67%, respectivamente. Após 360min, a sobrevivência desses microrganismos foi de 30% e 55% respectivamente. Para *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a sobrevivência foi inferior a 5% em ambos tratamentos.

O mecanismo de indução de estresse nos microrganismos pela bile é complexo e ainda não totalmente esclarecido, tendo em vista as diferentes concentrações biliares e o tempo de permanência em cada compartimento do trato intestinal. MARTEAU *et al.* (1997) verificaram que o efeito bactericida da bile simulada foi maior que a do suco biliar no organismo. Segundo esses autores, os sais biliares na bile simulada estão desconjugados, sendo mais deletérios para os microrganismos. Apesar de, em alguns trabalhos, a bile ter sido vista como fator limitante para sobrevivência dos probióticos, ZARATE *et al.* (2000) verificaram que o tratamento com sais biliares aumentou a atividade de β -galactosidase dos probióticos presentes em iogurte, auxiliando na digestão de lactose em pessoas com deficiência de lactase.

SUSKOVIC *et al.* (2000) verificaram que *L. acidophilus* M92 é tolerante à oxgall e sais biliares, especialmente taurocolato. Esse microrganismo multiplicou-se bem na presença de 0,3% de oxgall e sais biliares (conjugados e desconjugados) até atingir a fase estacionária em 8h.

A resistência de *L. casei* Shirota às condições de estresse impostas pelo trato gastrintestinal é conhecida, mas ainda faltam dados conclusivos a respeito

da resistência de outras linhagens de *L. casei* a valores extremos de pH e às enzimas presentes nos sucos gástrico e entérico. Pouco se sabe também sobre o efeito protetor de componentes presentes no leite sobre essas bactérias.

3. OBJETIVOS

O presente projeto foi idealizado com o objetivo de contribuir com mais dados para esclarecimento de algumas dúvidas ainda existentes em relação às culturas probióticas de grande relevância para a indústria de produtos lácteos.

Assim, objetivou-se:

1. avaliar o desempenho de diferentes condições de cultivo laboratorial de diferentes culturas lácticas e probióticas, variando composição do meio de cultura, forma de semeadura e condições de incubação;
2. empregando as melhores condições de cultivo possíveis, conforme determinado no item anterior, avaliar o comportamento de duas culturas probióticas (*Lactobacillus casei* Shirota e Lc01) durante a passagem pelo trato gastrointestinal, expondo-as a valores extremos de pH e às enzimas presentes nos sucos gástrico e entérico, empregando-se modelos simulados *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1. Avaliação das condições para o cultivo de culturas lácticas e probióticas

Esta etapa do trabalho foi dividida em duas partes. Inicialmente efetuou-se uma avaliação microbiológica qualitativa, observando-se presença ou ausência de crescimento de culturas de bactérias lácticas e probióticas, testada em diferentes condições laboratoriais. Na segunda etapa, a avaliação microbiológica foi quantitativa, efetuando-se a contagem das colônias nas diferentes condições laboratoriais estudadas. A influência das seguintes variáveis foi avaliada:

- composição do meio de cultura;
- técnica de semeadura: em profundidade e em superfície;
- temperatura de incubação: 37°C e 42°C em estufa;
- atmosfera de incubação: anaerobiose (sistema Anaerogen OXOID) e aerobiose (incubação em atmosfera normal).

4. 1. 1. Culturas

O estudo foi realizado com culturas puras liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* La05, *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium animalis* Bb12, e co-culturas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Fermento RICH), fornecidas pela Chr. Hansen S/A (Valinhos-SP). As culturas

foram mantidas de acordo com instruções do fabricante, sob refrigeração, até o uso para os testes.

Cada cultura foi reativada individualmente em leite esterilizado Molico reconstituído (2,5g/25mL de água estéril), a 121°C por 15min, suplementado com 2% de glicose e 1% de extrato de levedura. A incubação foi realizada a 37°C por 24h (SHAH e RAVULA, 2000).

4. 1. 2. Meios de Cultura

Vinte e um meios de cultura, divididos em quatro categorias, foram incluídos na avaliação:

- não-seletivos:
 - ágar **MRS** (OXOID);
 - ágar **M17** (OXOID);
 - ágar **MRS 5,4**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) com pH ajustado a 5,4 com ácido acético glacial (IDF, 1995);
 - ágar **C-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,05% (p/v) de cisteína (SHAH, 2000);
- meios modificados:
 - ágar **T-MRS**, correspondente ao ágar MRS contendo 2% (p/v) de trealose, preparado através de formulação do ágar MRS, com substituição da glicose da fórmula por trealose. A solução de trealose foi esterilizada por filtração [filtro Millipore, 0,45µm, (Millipore

- Corporation)], e adicionada ao meio formulado previamente esterilizado (IDF, 1995);
- ágar **M-MRS**, correspondente ao ágar MRS contendo 2% (p/v) de maltose, preparado através de formulação do ágar MRS, com substituição da glicose da fórmula por maltose. A solução de maltose foi esterilizada por filtração [filtro Millipore, 0,45 μ m, (Millipore Corporation)], e adicionada ao meio formulado previamente esterilizado (IDF, 1995);
 - meios seletivos sem antibióticos:
 - ágar **LC**, segundo composição descrita na Tabela 2 (SHAH, 2000);
 - ágar **LP-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,2% (p/v) de cloreto de lítio e 0,3% (p/v) de propionato de sódio (LAPIERRE *et al.*, 1992);
 - ágar **LP-C-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,05% (p/v) de cisteína, 0,2% (p/v) de cloreto de lítio e 0,3% (p/v) de propionato de sódio;
 - ágar **BL-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,15% (p/v) de sais biliares (IDF, 1995; VINDEROLA 1999 e 2000);
 - ágar **BL-C-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,02% (p/v) de sais biliares e 0,05% (p/v) de cisteína;

- meios seletivos com antibióticos:
 - ágar **ABC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,00005% (p/v) de dicloxacilina, 0,11% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína (PEDERSEN, 1993);
 - ágar **2ABC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,0001% (p/v) de dicloxacilina, 0,11% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína;
 - ágar **4ABC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,0002% (p/v) de dicloxacilina, 0,11% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína;
 - ágar **A5BC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,00005% (p/v) de dicloxacilina, 0,55% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína;
 - ágar **2A5BC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,0001% (p/v) de dicloxacilina, 0,55% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína;
 - ágar **4A5BC-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,0002% (p/v) de dicloxacilina, 0,55% (p/v) de cloreto de lítio e 0,05% (p/v) de cisteína;
 - ágar **BL-G-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,02% (p/v) de sais biliares e 0,003% (p/v) de gentamicina (LIM *et al.*, 1995);

- ágar **BL-G-C-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,02% (p/v) de sais biliares, 0,003% (p/v) de gentamicina e 0,05% (p/v) de cisteína;
- ágar **G-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,003% (p/v) de gentamicina (LIM *et al.*, 1995);
- ágar **G-C-MRS**, correspondente ao ágar MRS (OXOID) suplementado com 0,003% (p/v) de gentamicina e 0,05% (p/v) de cisteína.

Tabela 2. Composição do ágar LC (SHAH, 2000).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Peptona	10g
Extrato de Carne	4g
Extrato de Levedura	1g
Tween 80	1mL
KH ₂ PO ₄	2g
Acetato de Sódio. 3H ₂ O	3g
Citrato Tri-amônio	1g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,05g
Hidrolisado Ácido de Caseína	1g
Ágar Bacteriológico	12g
Água (q.s.p)	1L

4. 1. 3. Análise microbiológica qualitativa

Empregando-se uma alça de níquel-cromo com 2-3mm de diâmetro, as culturas reativadas previamente em leite foram semeadas por estrias na superfície dos meios de cultura distribuídos em oito placas de Petri, até o esgotamento do conteúdo da alça. Quatro placas semeadas foram incubadas a 37°C por 72h, sendo duas em aerobiose e duas em anaerobiose. As quatro placas remanescentes foram incubadas a 42°C, sendo duas em aerobiose e duas em anaerobiose. Para anaerobiose, empregou-se o Sistema GasPak-Anaerogen (OXOID). Após a incubação, observou-se o crescimento das culturas semeadas. A pureza das culturas foi conferida através da coloração de Gram e visualização da morfologia das colônias por microscopia óptica.

4. 1. 4. Análise microbiológica quantitativa

Em função dos resultados obtidos na avaliação microbiológica qualitativa, selecionou-se quatro meios de cultura e quatro culturas probióticas para a avaliação microbiológica quantitativa. Os meios selecionados foram os ágaros MRS, MRS 5,4, LP-MRS e BL-MRS, com incubação a 37°C e 42°C, em aerobiose e anaerobiose, com semeadura em superfície e profundidade. As culturas probióticas empregadas foram *B. animalis* Bb12, *L. acidophilus* La05, *L. casei* Lc01 e *L. casei* Shirota.

As culturas liofilizadas (1g) de *L. acidophilus* La05, *B. bifidum* Bb12 e *L. casei* Lc01 foram dissolvidas separadamente em 10mL de solução salina

(0,85% p/v), e submetidas à diluição decimal seriada até 10^{-9} empregando-se o mesmo diluente. Para estudo de *Lactobacillus casei* Shirota, empregou-se leite fermentado Yakult, com 16 dias de fabricação, fornecido pela Yakult S. A Indústria e Comércio. O leite fermentado Yakult também foi submetido à diluição decimal seriada até 10^{-9} empregando-se solução salina (0,85% p/v). Alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram semeadas por esgotamento na superfície dos meios contidos em oito placas de Petri. Simultaneamente, alíquotas de 1mL foram semeadas por profundidade em oito placas de Petri. Quatro placas semeadas em superfície foram incubadas a 37°C, sendo duas em aerobiose e duas em anaerobiose. As outras quatro placas semeadas em superfície foram incubadas a 42°C, sendo duas em aerobiose e duas em anaerobiose. O mesmo foi feito para as placas semeadas em profundidade. Após 72h de incubação, selecionou-se as placas que continham entre 25 e 250 colônias, enumerando-se as colônias com auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus – Phoenix). A média aritmética das duplicatas com esse número de colônias foi calculada, e, em seguida, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das culturas. Os experimentos foram repetidos três vezes.

4. 2. Avaliação da resistência das culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados

4. 2. 1. Culturas probióticas empregadas

Foram utilizadas duas culturas probióticas empregadas em leites fermentados comerciais: *Lactobacillus casei* Shirota (Regulador Intestinal - Yakult S. A Indústria e Comércio) e *Lactobacillus casei* Lc01 (Chr. Hansen). As culturas liofilizadas fornecidas pelos fabricantes foram armazenadas sob refrigeração até o momento do uso.

4. 2. 2. Avaliação da resistência das culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados

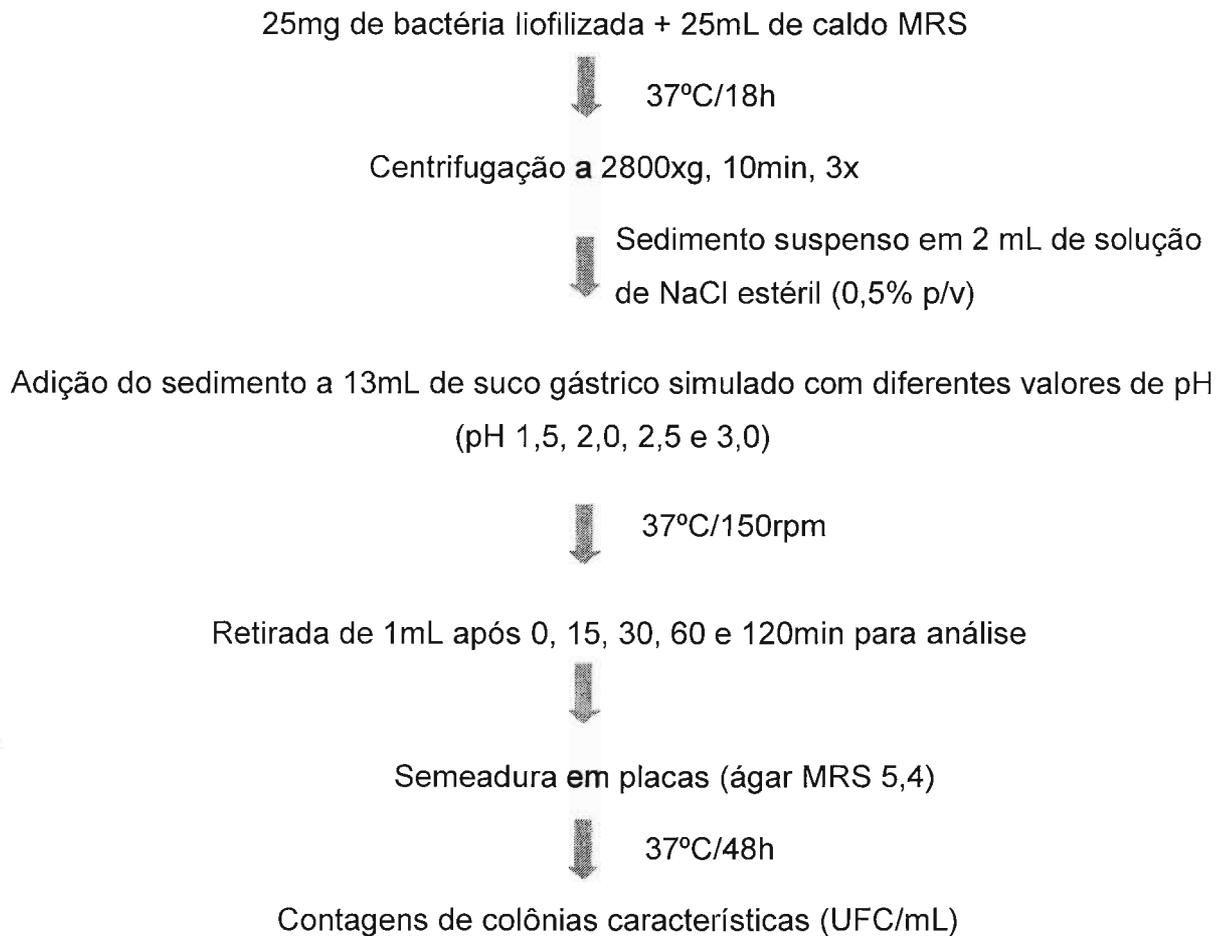
Para o estudo da resistência aos sucos gástrico e entérico, 25mg de cada cultura probiótica foram dissolvidas em 25mL de caldo MRS, incubando-se a 37°C por 18h. Após este período, a cultura foi centrifugada (Centrífuga refrigerada Hettich Zentrifugen, modelo Mikro 22R) a 2800xg, por 10min, utilizando-se solução de NaCl estéril (0,5% p/v) para ressuspender as células. A centrifugação foi realizada por três vezes.

O suco gástrico simulado constituiu-se de solução de NaCl estéril (0,5% p/v) com pH ajustado para 1,5, 2,0, 2,5 ou 3,0 com HCl, à qual se adicionou 3g/L de pepsina (Sigma). O suco entérico simulado constituiu-se de solução de

NaCl estéril (0,5% p/v) com pH ajustado para 8,0 com NaOH 0,1mM, à qual se adicionou 1g/L pancreatina (Sigma) e 10g/L de bile (Sigma).

O procedimento para avaliação da resistência aos sucos gástrico e entérico simulados foi o recomendado por KOS *et al.* (2000), com modificações. Alíquotas de 2mL das culturas de *Lactobacillus casei* Shirota ou *Lactobacillus casei* Lc01, previamente ativadas em caldo MRS, foram transferidas para tubos contendo 13mL de suco gástrico simulado com os diferentes valores de pH. Os tubos contendo suco gástrico simulado e inoculados com *L. casei* Shirota ou *L. casei* Lc01 foram incubados a 37°C por 120min em agitador rotatório (150rpm). Amostras de 1mL foram retiradas após 0, 15, 30, 60 e 120min de incubação e submetidas à diluição decimal seriada em solução salina (0,85% p/v). Alíquotas de 1ml das diluições foram semeadas em profundidade em ágar MRS 5,4, em duplicatas, as placas foram incubadas a 37°C por 48h, e então foi realizada a contagem total das colônias, calculando-se o número de UFC/mL para cada tratamento (Esquema 1).

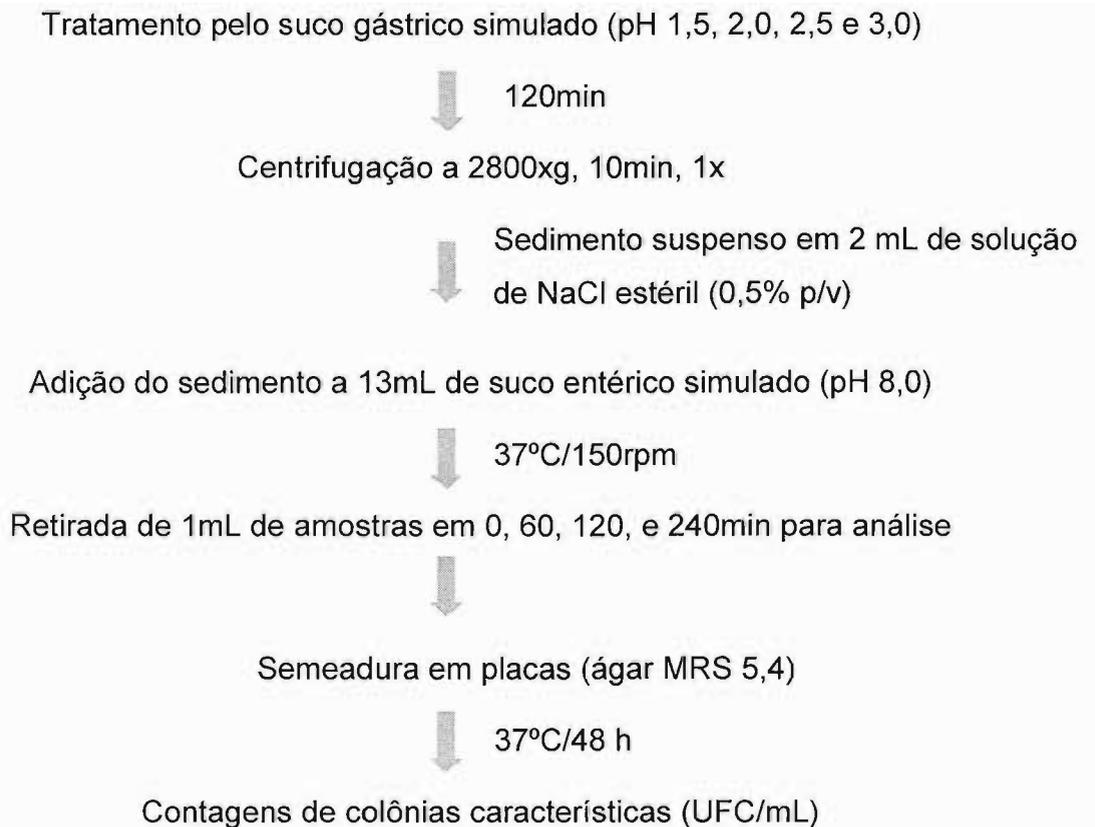
Esquema 1. Avaliação da resistência das culturas probióticas ao suco gástrico simulado.



Após o tratamento em suco gástrico simulado, as culturas foram avaliadas quanto à sua sobrevivência no suco entérico simulado (pH 8,0) contendo 10g/L de bile e 1g/L de pancreatina. As culturas tratadas com suco gástrico foram centrifugadas a 2800xg, por 10min, por uma única vez. Após descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram suspensos em 2mL de solução de NaCl estéril (0,5% p/v) e transferidos para tubos contendo 13mL de suco entérico simulado. Em seguida, os tubos contendo suco entérico simulado inoculados com as culturas provenientes do suco gástrico simulado foram

incubadas a 37°C, por 240min em agitador rotatório (150rpm), retirando-se alíquotas de 1mL após 0, 60, 120 e 240min. As alíquotas foram submetidas à diluição decimal seriada em solução salina (0,85% p/v), e semeadas em profundidade em ágar MRS 5,4, em duplicatas. Após a incubação a 37°C por 48h, realizou-se a contagem das colônias, calculando-se o número de UFC/mL para cada tratamento, considerando a média das contagens nas duplicatas (Esquema 2).

Esquema 2. Avaliação da resistência das culturas probióticas ao suco entérico simulado.



4. 2. 3. Avaliação do efeito protetor do leite na resistência de culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados

Para avaliação do efeito protetor do leite, as culturas de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01, reativadas em caldo MRS e centrifugadas três vezes, foram ressuspensas em 25mL de leite desnatado Molico reconstituído (2,5g/25mL de água estéril). Em seguida, foi realizado o procedimento conforme descrito no item 4.2.2. O procedimento para avaliação do efeito protetor do leite na resistência das culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico simulados foi o recomendado por FERNANDÉZ *et al.* (2003).

4. 2. 4. Avaliação da resistência das culturas probióticas à pepsina, bile e pancreatina

Para o estudo da resistência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 à pepsina, bile e pancreatina, 25mg de cada uma dessas culturas liofilizadas foram dissolvidas em 25mL de caldo MRS, incubando-se a 37°C por 18h. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 2800xg, por 10min, por três vezes, empregando-se solução de NaCl estéril (0,5% p/v) para ressuspender o sedimento.

Para a avaliação da resistência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 à pepsina empregou-se suco gástrico simulado (solução de NaCl estéril 0,5% p/v) com pH 3,0, contendo 3g/L de pepsina.

Para a avaliação da resistência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 à bile e à pancreatina, empregou-se suco entérico simulado (solução de NaCl estéril 0,5% p/v), com pH 8,0, contendo 1g/L pancreatina e 10g/L de bile.

4. 3. Tratamento dos dados e análise estatística

Os resultados referentes aos experimentos de avaliação quantitativa das condições de cultivos das quatro culturas probióticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (duplo fator amostras e repetições), e ao teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$), para verificar significância das diferenças obtidas nos tratamentos efetuados. Para isso, utilizou-se o Pacote Estatístico SAS (SAS, 1992).

Os resultados referentes aos experimentos de avaliação da resistência de culturas probióticas aos sucos gástrico e entérico foram expressos como médias das três repetições. Nos gráficos, foram acrescentados os valores do desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1. Otimização do cultivo diferencial *in vitro*

5. 1. 1. Avaliação microbiológica qualitativa

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes à capacidade de desenvolvimento das culturas lácticas e probióticas nos diferentes meios e nas condições de cultivo estudadas. Os resultados indicam que todas estas culturas se desenvolveram nos ágaros não-seletivos MRS, MRS pH 5,4 e C-MRS, quando incubadas em anaerobiose e aerobiose, nas duas temperaturas (37°C e 42°C).

Os ágaros M-MRS, BL-MRS e aqueles adicionados de gentamicina (BL-G-MRS, BL-G-C-MRS, G-C-MRS e G-MRS), quando incubados a 37°C, permitiram o crescimento de *L. acidophilus* La05, *L. casei* Lc01 e *B. animalis* Bb12, e inibiram o crescimento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, que não são capazes de fermentar a maltose (M) e são sensíveis aos sais biliares (BL) e gentamicina (G) adicionados ao ágar MRS (IDF, 1995; VINDEROLA e REINHEIMER, 2000). Nos ágaros LC e T-MRS, houve crescimento de *L. casei* Lc01 e *L. acidophilus* La05, mas não de *B. animalis* Bb12, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, indicando que podem ser utilizados para contagens desses dois microrganismos quando em mistura com os demais. Nestes dois meios, pode-se diferenciar *L. casei* Lc01 e *L. acidophilus* La05 através da morfologia das colônias, sendo que *L. casei* Lc01

apresenta borda regular e aparência leitosa, e *L. acidophilus* La05 borda irregular e colônias translúcidas.

Ágares contendo cloreto de lítio e dicloxacilina (LP-MRS, LP-C-MRS, ABC-MRS e 2ABC-MRS) foram seletivos para *L. casei* Lc01 e *B. animalis* Bb12 devido à presença de pelo menos um desses dois compostos. Foi observado que a adição de dicloxacilina, propionato de sódio e cloreto de lítio em concentrações mais elevadas aos ágares 4ABC-MRS, A5BC-MRS, 2A5BC-MRS e 4A5BC-MRS tornou-os inibitórios para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* La05 e *L. casei* Lc01. Portanto, esses ágares podem ser usados para contagem *B. animalis* Bb12 quando em cultura mista com algum desses microrganismos.

Tabela 3. Crescimento de culturas lácticas e probióticas semeadas por esgotamento na superfície de diferentes meios de cultura e condições de cultivo.

MEIOS	Culturas													
	<i>L. acidophilus</i> La05				<i>L. casei</i> Lc01				<i>B. animalis</i> Bb12		<i>S.thermophilus/ L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>			
	ANA*		AE**		ANA		AE		ANA		ANA		AE	
	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
MRS	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C-MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MRS pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M17	- ²	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
T-MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M-MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LP-MRS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LP-C-MRS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ABC	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
2ABC	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4ABC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A5BC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2A5BC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4A5BC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
BL-MRS	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
BL-C-MRS	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
BL-G-MRS	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
BL-G-C-MRS	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
G-C-MRS	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
G-MRS	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-

ANA*: Anaerobiose; AE**: Aerobiose

+¹: com crescimento

-²: sem crescimento

5. 1. 2. Avaliação microbiológica quantitativa

Nas Tabelas 4 a 7 e Figuras 3 a 6 estão apresentadas as contagens obtidas para *B. animalis* Bb12, *L. acidophilus* La05, *L. casei* Lc01 e *L. casei* Shirota. A análise dos resultados apresentados permite verificar que as contagens obtidas nos ágares selecionados e condições de cultivo foram muito semelhantes, portanto todos os ágares avaliados podem ser utilizados para contagens das bactérias probióticas estudadas neste trabalho. Entretanto, a análise estatística permitiu identificar diferenças significativas em alguns casos conforme exposto a seguir.

5. 1. 2. 1. Avaliação microbiológica quantitativa de *Bifidobacterium animalis* Bb12

Os resultados referentes a esse microrganismo estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 3.

Tabela 4. Contagens de *Bifidobacterium animalis* Bb12 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).

	Condições de Cultivo			
	37°C		42°C	
	SP	PP	SP	PP
MRS	10,596 ^{abB2}	10,733 ^{aA1}	10,378 ^{bbB2}	10,806 ^{aA1}
MRS 5,4	10,498 ^{abB2}	10,628 ^{baA1}	10,538 ^{abB1}	10,687 ^{baA1}
BL-MRS	10,313 ^{aA1}	10,639 ^{baA1}	10,603 ^{aA1}	10,665 ^{baA1}
LP-MRS	10,621 ^{abB1}	10,693 ^{abA1}	10,521 ^{aA1}	10,591 ^{baA1}

SP: semeadura em superfície; PP: semeadura em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; ágar LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

- Letras minúsculas iguais para uma mesma coluna: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para os meios de cultura.
- Letras maiúsculas iguais para uma mesma linha, considerando a mesma temperatura: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para a forma de semeadura.
- Mesmo número para uma mesma linha: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para as duas temperaturas.

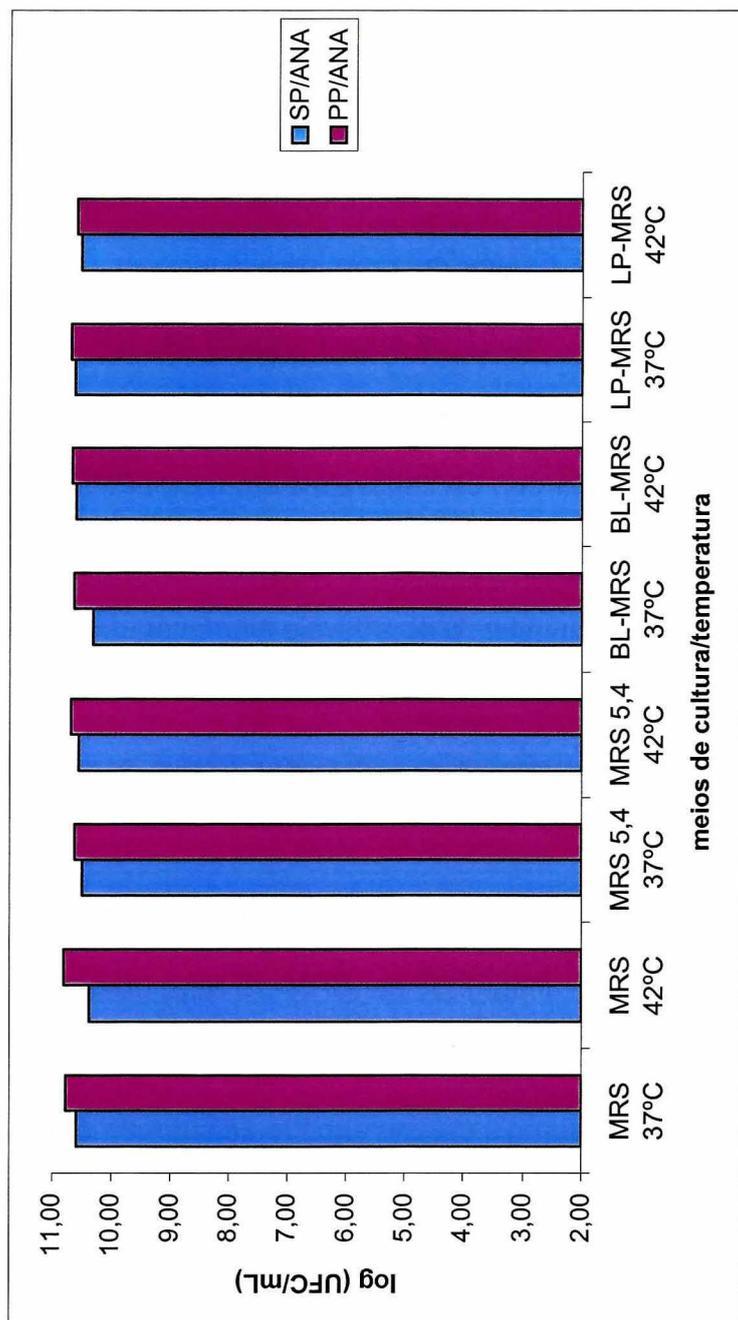


Figura 3. Contagens de *Bifidobacterium animalis* Bb12 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com sementeira em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em anaerobiose.

ANA: anaerobiose; SP: sementeira em superfície; PP: sementeira em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; ágar LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

5. 1. 2. 1. 1. Influência dos componentes do meio de cultura

As contagens de *B. animalis* Bb12 foram consideradas semelhantes nos quatro meios avaliados quando a semeadura foi feita em superfície e com incubação a 37°C (Tabela 4 e Figura 3). Porém, quando a semeadura foi feita em profundidade, a contagem de *B. animalis* Bb12 no ágar MRS foi mais alta que nos demais ágares ($p \leq 0,05$). Os resultados nos ágares MRS 5,4, BL-MRS e LP-MRS não diferiram entre si.

A 42°C, as contagens de *B. animalis* Bb12 nos ágares MRS 5,4, BL-MRS e LP-MRS foram mais elevadas do que em ágar MRS, quando a semeadura foi em superfície. Porém, quando a semeadura foi em profundidade observou-se uma contagem mais elevada de *B. animalis* Bb12 no ágar MRS (Tabela 4).

5. 1. 2. 1. 2. Influência da forma de semeadura

Em relação à forma de semeadura (Tabela 4), observou-se que, com exceção do ágar BL-MRS, as contagens de *B. animalis* Bb12 nos ágares MRS, MRS 5,4 e LP-MRS semeados em profundidade e incubados a 37°C foram superiores àsquelas obtidas nesses ágares semeados em superfície. A 42°C, as contagens de *B. animalis* Bb12 nos ágares MRS e MRS 5,4 semeados em profundidade foram superiores àsquelas obtidas nesses ágares quando semeados em superfície, e não se observou uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) nas contagens de *B. animalis* Bb12 obtidas nos ágares BL-MRS e LP-MRS para as duas semeaduras estudadas.

Segundo LAPIERRE *et al.* (1992), o cloreto de lítio e o propionato de sódio, adicionados ao meio LP-MRS, reduzem o potencial redox e criam uma condição de anaerobiose, fazendo com que a forma de semeadura dos meios não tenha influência na contagem. Essa ação desses dois compostos foi comprovada nesse trabalho.

5. 1. 2. 1. 3. Influência da temperatura de incubação

Quanto à temperatura de incubação (Tabela 4), não houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nas contagens de *B. animalis* Bb12 feitas nas placas incubadas a 37°C e a 42°C, exceto no ágar MRS 5,4, semeado em superfície e incubado a 37°C, que apresentou contagem de *B. animalis* Bb12 mais baixa que a 42°C, e no ágar MRS, semeado em superfície, independente da temperatura de incubação.

5. 1. 2. 2. Avaliação microbiológica quantitativa de *Lactobacillus acidophilus* La05

Os resultados referentes a esse microrganismo estão apresentados na Tabela 5 e Figura 4.

Tabela 5. Contagens de *Lactobacillus acidophilus* La05 (log UFC/mL) em 3 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).

	Condições de Cultivo							
	37°C				42°C			
	AE		ANA		AE		ANA	
	SP	PP	SP	PP	SP	PP	SP	PP
MRS	9,750 ^{bb1}	10,785 ^{aA1}	9,720 ^{bb1}	10,765 ^{aA1}	9,713 ^{bb1}	10,053 ^{cA1}	9,656 ^{aC2}	10,734 ^{aA1}
MRS 5,4	10,863 ^{aA1}	10,846 ^{aA1}	10,826 ^{aA1}	10,820 ^{aA1}	10,782 ^{aB1}	10,867 ^{aA1}	9,707 ^{aD2}	10,652 ^{aC1}
BL-MRS	9,642 ^{cb1}	10,100 ^{ba1}	9,646 ^{cb1}	10,115 ^{ba1}	9,669 ^{bc1}	10,378 ^{ba1}	9,684 ^{ac1}	10,085 ^{bb1}

AE: aerobiose; ANA: anaerobiose; SP: semeadura em superfície; PP: semeadura em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile.

- Letras minúsculas iguais para uma mesma coluna: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para os meios de cultura.
- Letras maiúsculas iguais para uma mesma linha, considerando a mesma temperatura: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para a forma de semeadura.
- Mesmo número para uma mesma linha: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para as duas temperaturas.

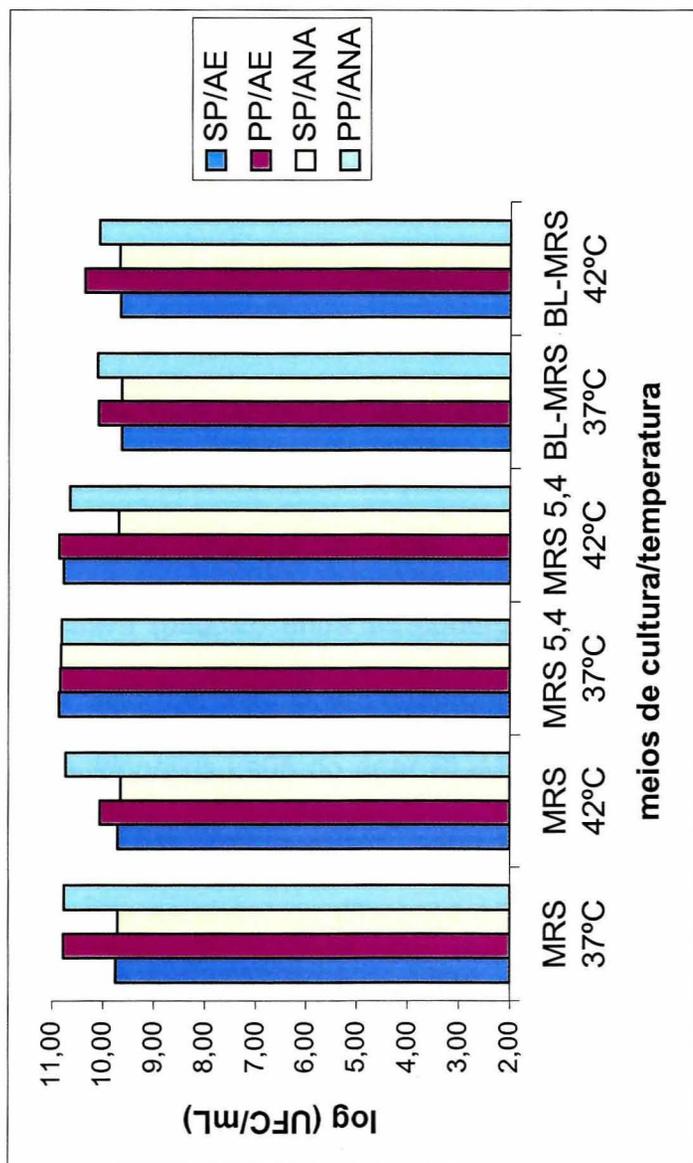


Figura 4. Contagens de *Lactobacillus acidophilus* La05 (log UFC/mL) em 3 meios de cultura, com sementeira em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose.

AE: aerobiose; ANA: anaerobiose; SP: sementeira em superfície; PP: sementeira em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile.

5. 1. 2. 2. 1. Influência dos componentes do meio de cultura

Dos três meios nos quais foi possível enumerar *L. acidophilus* La05 (MRS, MRS 5,4 e BL-MRS) (Tabela 5), a contagem mais elevada foi obtida no ágar MRS 5,4, a 37°C, em aerobiose e anaerobiose e semeadura feita em superfície. Não se observou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens de *L. acidophilus* La05 nos ágares MRS e MRS 5,4, a 37°C, em aerobiose e anaerobiose, em semeadura feita em profundidade, porém a contagem desses dois ágares foram superiores as obtidas no ágar BL-MRS.

A 42°C, a contagem de *L. acidophilus* La05 no ágar MRS 5,4 foi mais elevada em aerobiose, tanto para semeadura feita em superfície quanto em profundidade (Tabela 5). Não se observou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens de *L. acidophilus* La05 nos ágares MRS e MRS 5,4, a 42°C, em anaerobiose, nas duas semeaduras. As contagens de *L. acidophilus* La05 no ágar BL-MRS ficaram inferiores àquelas obtidas no ágar MRS 5,4, exceto a 42°C, em anaerobiose e semeadura em superfície, onde a não se observou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre ao ágares MRS, MRS 5,4 e BL-MRS.

5. 1. 2. 2. 2. Influência da forma de semeadura

Em relação à forma de semeadura, observou-se que aquelas feitas em profundidade no ágar MRS, nas duas temperaturas e atmosfera de incubação, no ágar BL-MRS, tanto em aerobiose e anaerobiose a 37°C, e em aerobiose a

42°C resultaram em contagens de *L. acidophilus* La05 mais elevadas que aquelas obtidas em semeadura feita em superfície (Tabela 5). No ágar MRS 5,4, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos resultados obtidos com as diferentes formas de semeadura a 37°C. Observou-se contagem de *L. acidophilus* La05 mais elevada em semeadura em profundidade a 42°C no ágar MRS 5,4 incubado em aerobiose.

5. 1. 2. 2. 3. Influência da temperatura de incubação

Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as contagens de *L. acidophilus* La05 nos ágares MRS, MRS 5,4 e BL-MRS, exceto nos ágares MRS e MRS 5,4, incubados a 42°C, em anaerobiose e semeadura realizadas em superfície, onde as contagens de *L. acidophilus* La05 foram mais baixas.

5. 1. 2. 3. Avaliação microbiológica quantitativa de *Lactobacillus casei* Lc01

Os resultados referentes a esse microrganismo estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 5.

Tabela 6. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).

	Condições de cultivo							
	37°C				42°C			
	AE		ANA		AE		ANA	
	SP	PP	SP	PP	SP	PP	SP	PP
MRS	10,431 ^{bA1}	10,301 ^{bB1}	10,461 ^{bA1}	10,396 ^{bA1}	10,135 ^{cC2}	10,436 ^{bA1}	10,474 ^{bA1}	10,336 ^{bB1}
MRS 5,4	11,801 ^{aA1}	11,631 ^{aA1}	11,700 ^{aA1}	11,837 ^{aA1}	11,802 ^{aA1}	11,680 ^{aA1}	11,839 ^{aA1}	11,702 ^{aA1}
BL-MRS	10,626 ^{bA1}	10,434 ^{bB1}	10,491 ^{bB1}	10,523 ^{bA1}	10,526 ^{bA1}	10,499 ^{bA1}	10,535 ^{bA1}	10,414 ^{bA1}
LP-MRS	10,220 ^{bB1}	10,347 ^{bA1}	10,252 ^{bB1}	10,345 ^{bA1}	10,183 ^{cB1}	10,684 ^{bA1}	10,106 ^{cB2}	10,629 ^{bA1}

AE: aerobiose; ANA: anaerobiose; SP: semeadura em superfície; PP: semeadura em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

- Letras minúsculas iguais para uma mesma coluna: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para os meios de cultura.
- Letras maiúsculas iguais para uma mesma linha, considerando a mesma temperatura: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para a forma de semeadura.
- Mesmo número para uma mesma linha: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para as duas temperaturas.

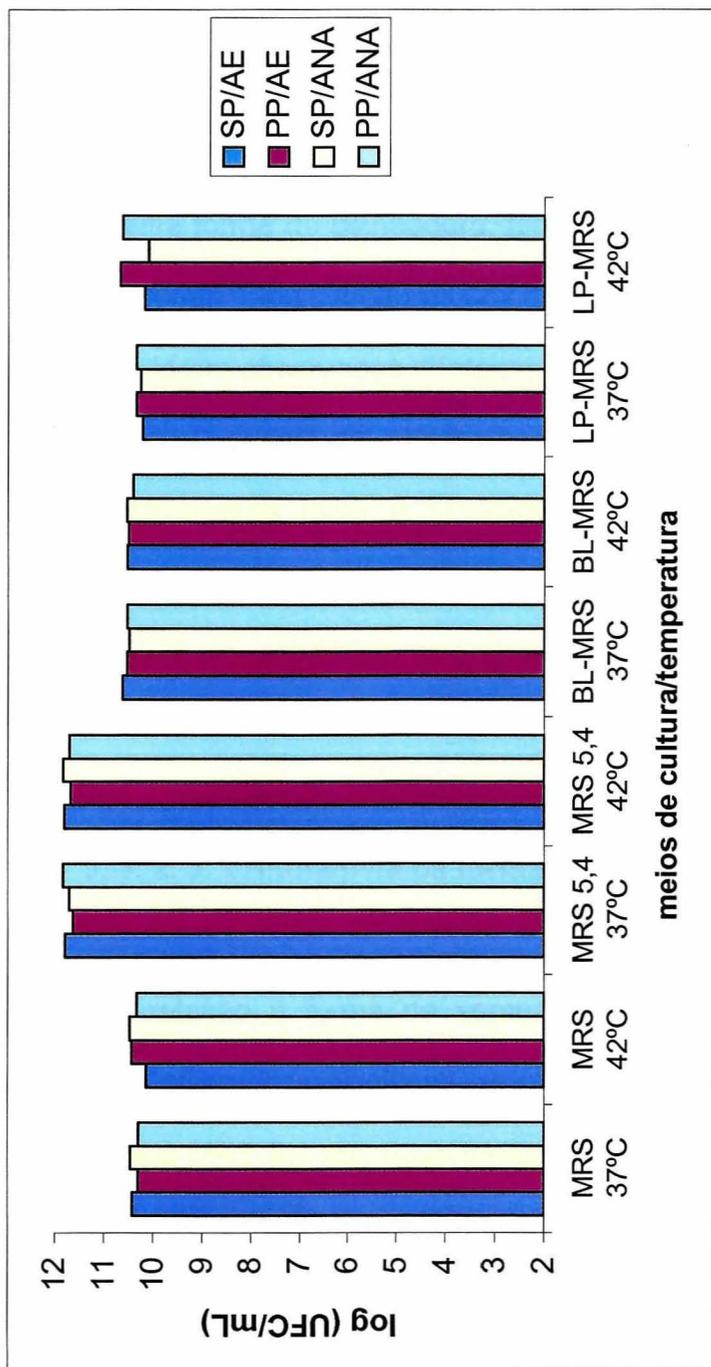


Figura 5. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com sementeira em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e anaerobiose.

AE: aerobiose; ANA: anaerobiose; SP: sementeira em superfície; PP: sementeira em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; ágar LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

5. 1. 2. 3. 1. Influência dos componentes do meio de cultura

Analisando os resultados apresentados na Tabela 6 e Figura 5, verifica-se que as contagens de *L. casei* Lc01 no ágar MRS 5,4 foram significativamente maiores ($p \leq 0,05$) que aquelas obtidas nos demais ágares. Independente forma de semeadura, temperatura e atmosfera de incubação, os resultados foram 1 log superiores aos demais ágares (Tabela 6).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as contagens de *L. casei* Lc01 obtidas nos demais ágares, com exceção daquelas obtidas nos ágares MRS e LP-MRS incubados a 42°C, em aerobiose e semeados em superfície, e no ágar LP-MRS incubado a 42°C, em anaerobiose e semeado a em superfície, que apresentaram as menores contagens de *L. casei* Lc01.

5. 1. 2. 3. 2. Influência da forma de semeadura

Em relação à forma de semeadura realizada (Tabela 6), não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as contagens de *L. casei* Lc01 no ágar MRS 5,4 nas duas temperaturas e atmosfera de incubação, e no ágar BL-MRS a 42°C, nas duas formas de semeadura e atmosfera de incubação. Observaram-se contagens mais baixas de *L. casei* Lc01 no ágar LP-MRS quando a semeadura foi realizada em superfície, nas duas temperaturas de incubação. No ágar BL-MRS, incubado a 37°C, as contagens mais elevadas de *L. casei* Lc01 foram observadas quando a semeadura foi feita em superfície

com incubação em aerobiose, e quando a semeadura foi realizada em profundidade e incubação em anaerobiose. Verificaram-se contagens mais baixas de *L. casei* Lc01 no ágar MRS, semeado em profundidade, incubado em aerobiose e a 37°C. Contagens mais elevadas de *L. casei* Lc01 foram observadas no ágar MRS incubado a 42°C para semeadura feita em profundidade e incubação em aerobiose, semeadura em superfície e incubação em anaerobiose, e no ágar LP-MRS para semeadura feita em profundidade, tanto em aerobiose quanto anaerobiose.

5. 1. 2. 3. 3. Influência da temperatura de incubação

Não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de *L. casei* Lc01 nos ágares MRS 5,4 e BL-MRS para as duas temperaturas estudadas (Tabela 6). Contagens mais baixas de *L. casei* Lc01 foram encontradas para placas de ágar MRS semeadas em superfície e incubadas em aerobiose, a 42°C. No ágar LP-MRS, as contagens mais baixas de *L. casei* Lc01 foram obtidas quando as placas semeadas em superfície foram incubadas a 42°C em anaerobiose.

5. 1. 2. 4. Avaliação microbiológica quantitativa de *L. casei* Shirota

Os resultados referentes a esse microrganismo estão apresentados na Tabela 7 e Figura 6.

Tabela 7. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com semeadura em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose e significância das diferenças obtidas ($p \leq 0,05$).

	Condições de cultivo			
	37°C		42°C	
	SP	PP	SP	PP
MRS	9,218 ^{aA1}	9,172 ^{aA1}	9,116 ^{abA1}	9,056 ^{bA2}
MRS 5,4	9,078 ^{bB1}	9,261 ^{aA1}	9,190 ^{aA1}	9,187 ^{aA1}
BL-MRS	9,190 ^{aA1}	9,182 ^{aA1}	9,060 ^{bA2}	9,015 ^{bA2}
LP-MRS	9,153 ^{abA1}	9,173 ^{aA1}	9,135 ^{abA1}	9,041 ^{bA1}

SP: semeadura em superfície; PP: semeadura em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; ágar LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

- Letras minúsculas iguais para uma mesma coluna: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para os meios de cultura.
- Letras maiúsculas iguais para uma mesma linha, considerando a mesma temperatura: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para a forma de semeadura.
- Mesmo número para uma mesma linha: não existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre os resultados para as duas temperaturas.

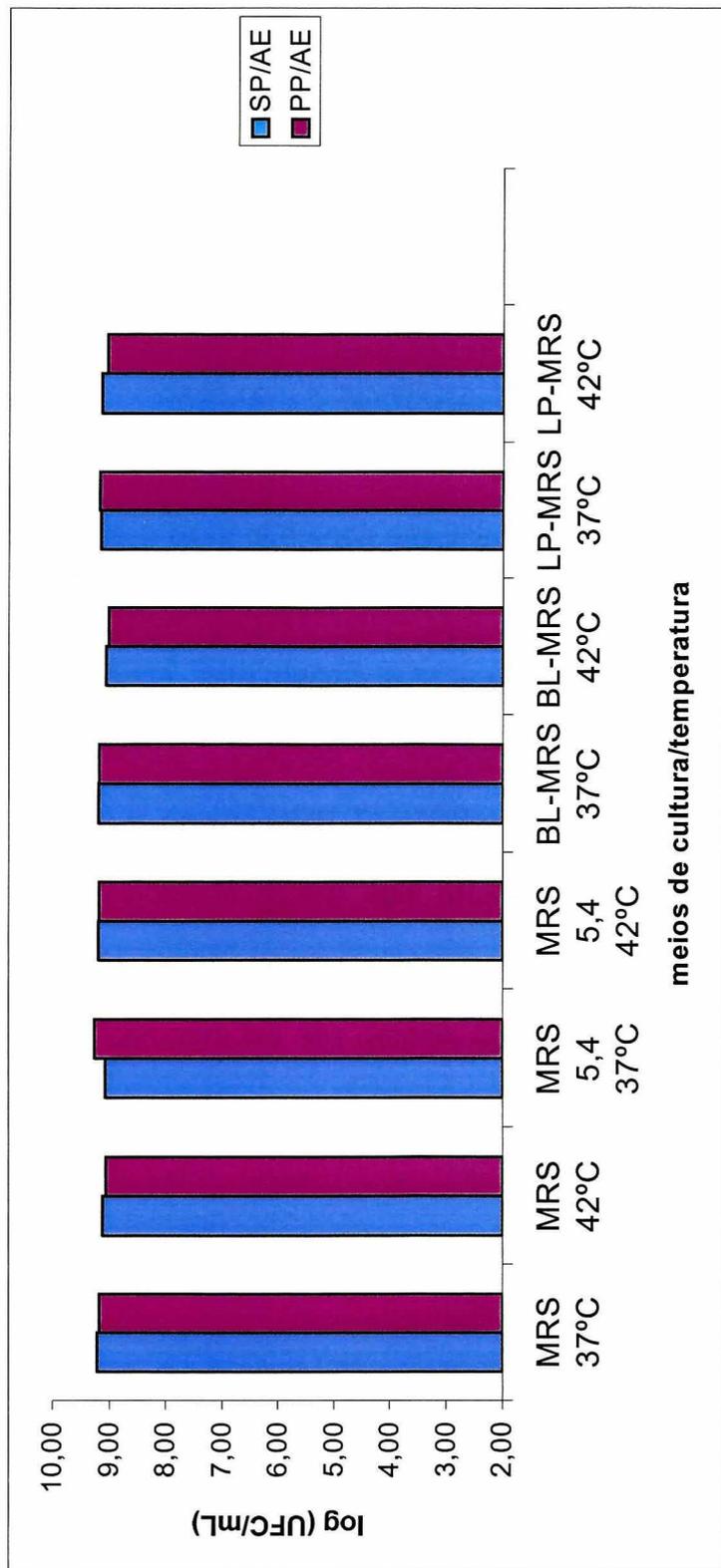


Figura 6. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) em 4 meios de cultura, com sementeira em superfície e em profundidade, incubação a 37°C e a 42°C, em aerobiose.

AE: aerobiose; SP: sementeira em superfície; PP: sementeira em profundidade; ágar MRS 5,4: ágar MRS pH 5,4; ágar BL-MRS: ágar MRS com bile; ágar LP-MRS: ágar MRS com cloreto de lítio e propionato de sódio.

5. 1. 2. 4. 1. Influência dos componentes do meio de cultura

Segundo os resultados apresentados na Tabela 7 e Figura 6, as contagens de *L. casei* Shirota foram muito próximas nos quatro ágaros testados. A análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens nesses ágaros quando a semeadura foi realizada em profundidade com incubação a 37°C. Uma contagem mais baixa de *L. casei* Shirota foi verificada no ágar MRS 5,4 incubado a 37°C, em semeadura em superfície e essa diferença em relação aos demais ágaros foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Já quando incubado a 42°C, e semeadura realizada em profundidade, este mesmo ágar apresentou as contagens mais elevadas de *L. casei* Shirota. Observou-se também uma contagem mais baixa de *L. casei* Shirota nos ágaros MRS, BL-MRS e LP-MRS incubados a 42°C em semeadura em profundidade e em ágar BL-MRS quando a semeadura foi feita em superfície, sendo essas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) quando comparadas aos demais ágaros semeados e incubados nas mesmas condições.

5. 1. 2. 4. 2. Influência da forma de semeadura

Com relação à forma de semeadura (Tabela 7), não se observou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as contagens de *L. casei* Shirota nas duas formas de semeadura. Entretanto, no ágar MRS 5,4, com

semeadura realizada em superfície e incubação a 37°C, a contagem de *L. casei* Shirota foi mais baixa que na semeadura feita em profundidade.

5. 1. 2. 4. 3. Influência da temperatura de incubação

Em relação à temperatura de incubação (Tabela 7), observou-se que as contagens de *L. casei* Shirota foram semelhantes na maioria dos meios testados. Contagens mais baixas de *L. casei* Shirota foram encontradas para incubação a 42°C no ágar MRS em profundidade, e no ágar BL-MRS, nas duas formas de semeadura, sendo essas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em relação aos resultados obtidos nos demais ágaros.

5. 2. Avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus casei* Lc01 no trato gastrintestinal

Os resultados da avaliação da capacidade de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 sobreviverem em suco gástrico com diferentes valores de pH (1,5, 2,0, 2,5 e 3,0) e em suco entérico com pH 8,0, após terem passado pelo suco gástrico nos diferentes pHs, estão apresentados nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Esses resultados indicam que as duas cepas tiveram um comportamento muito semelhante.

As Figuras 7 e 8 mostram que a sobrevivência dessas culturas no suco gástrico é dependente do pH. Após 30min de contato com o suco gástrico com pH 1,5, e após 60min de contato com suco gástrico com pH 2,0, não foi mais possível detectar bactérias sobreviventes pela metodologia analítica adotada. Após 15min de contato com o suco gástrico, a redução da contagem de células viáveis já havia sido da ordem de 4 ciclos log. Quando o pH do suco gástrico era 2,5, essa redução de 4 ciclos log ocorreu somente após 120min de contato. Já no suco gástrico com pH 3,0, não foi observada nenhuma redução no número de células viáveis, mesmo após o tempo máximo estudado, ou seja, 120min.

Os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10 indicam que o suco entérico simulado empregado nesse estudo foi capaz de reverter à injúria provocada pelo suco gástrico simulado utilizado, especialmente nos valores mais baixos de pH. Assim, aquelas células de *L. casei* Shirota ou Lc01 que não eram mais cultiváveis após contato com suco gástrico com pH 1,5 e 2,0,

passaram a apresentar contagens da ordem de 10^2 a 10^3 UFC/mL após o contato com suco entérico simulado.

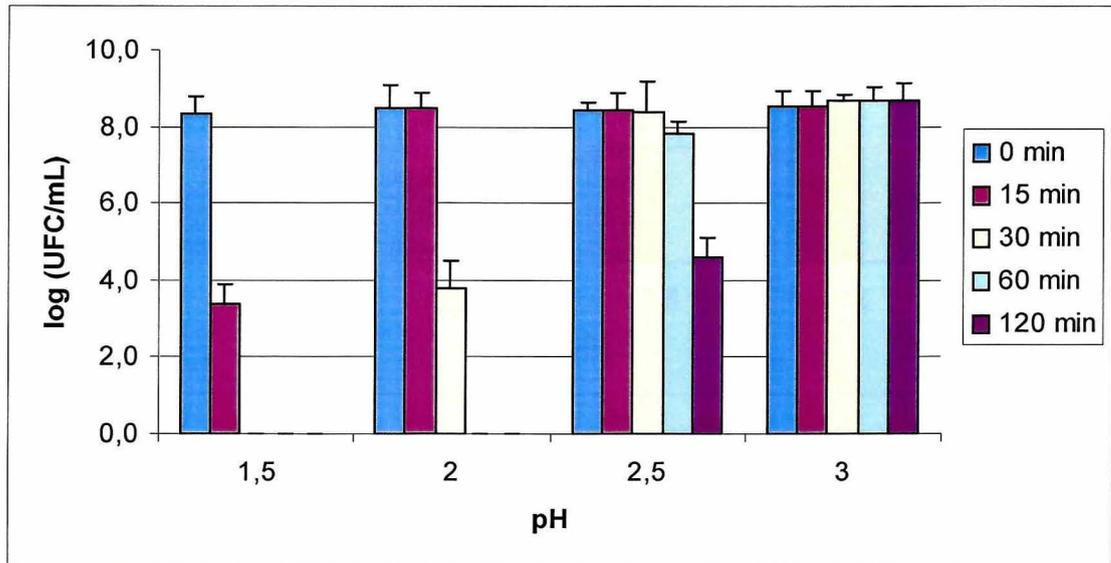


Figura 7. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por até 120min.

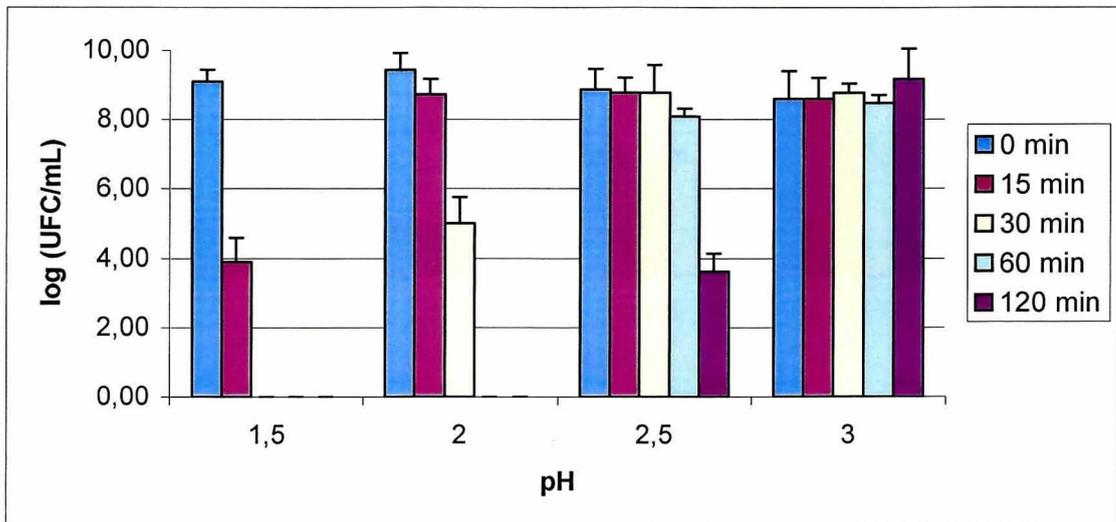


Figura 8. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por até 120min.

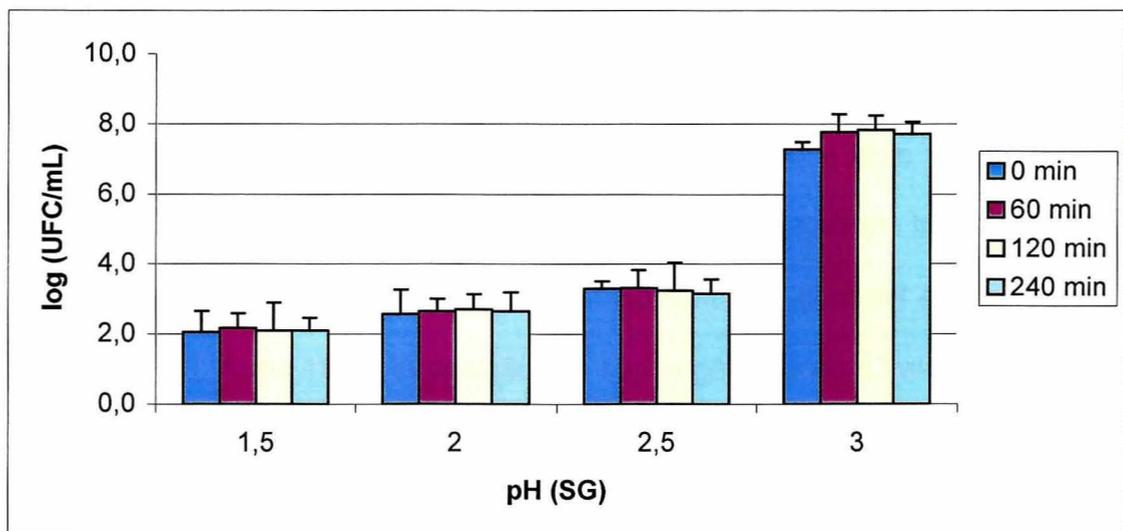


Figura 9. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min.

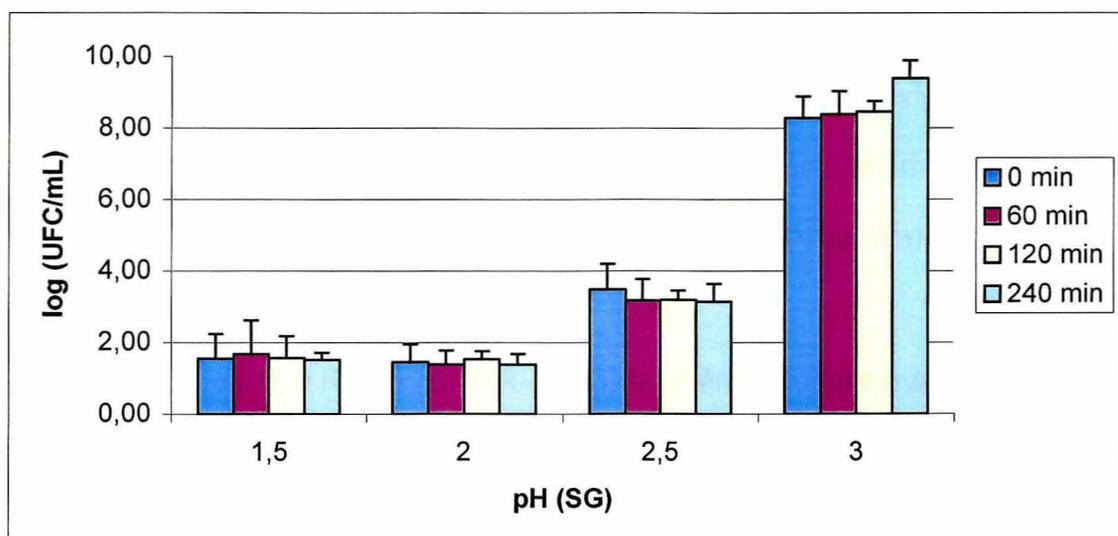


Figura 10. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min.

Outros pesquisadores relataram resultados semelhantes para outras culturas lácticas ou probióticas. KOS *et al.* (2000) examinaram a resistência de *L. acidophilus* M92 ao processo de digestão no estômago e trato gastrintestinal, para então avaliar seu potencial probiótico. Estes autores investigaram a sobrevivência dessa cultura em suco gástrico simulado com pH ajustado a 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0. Após 1h de exposição em sucos gástrico com valores de pH de 2,0, 2,5 e 3,0, a sobrevivência desta cepa foi alta (99%), mas após 2h de exposição nos mesmos valores de pH, as contagens diminuíram para 4,5, 6,5 e 7,5 log UFC/mL, respectivamente, de uma população inicial de 9 log UFC/mL. Já para suco gástrico com valor de pH 1,5, após 1h não foi observada a sobrevivência dessa bactéria. Baseados nesses resultados, os autores recomendaram que probióticos deveriam ser ingeridos com alimentos tamponados, como leite, iogurte e outras proteínas, já que indivíduos em jejum apresentam o pH do estômago em torno de 1-2, e muitos microrganismos, incluindo lactobacilos e bifidobactérias, sobrevivem a estas condições apenas por um curto período de tempo.

VINDEROLA e REINHEIMER (2003) também estudaram a resistência de bactérias lácticas e probióticas às condições impostas pelo TGI. Estes autores observaram que as bactérias lácticas *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* são mais sensíveis ao suco gástrico (pH 2,0) que bactérias probióticas. A maioria das culturas testadas (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis*) reduziram a contagem inicial em 6 ciclos log após passagem pelo TGI, após 3h de contato. Os autores observaram também que a presença de bile foi inibitória para as bactérias lácticas testadas.

Já as bactérias probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. lactis*, *B. longum*) foram mais resistentes ao suco gástrico e à bile do que as bactérias lácticas, porém também apresentaram perda de viabilidade.

DROUAULT *et al.* (1999) também verificaram que as condições impostas pelo duodeno, onde bile e suco pancreático são secretados, influenciam a viabilidade bacteriana, verificando que somente 10-30% das bactérias ingeridas sobrevivem.

A maioria das cepas estudadas por CHARTERIS *et al.* (1998 b), incluindo espécies de lactobacilos e bifidobactérias, perderam sua viabilidade durante o contato com suco gástrico simulado (pH 2,0). Estes autores verificaram que *L. casei* 212.3 e *L. rhamnosus* GG sobreviveram ao contato com suco entérico simulado (pH 8,0) e foram consideradas intrinsecamente resistentes ao trato gastrintestinal. *L. casei* F19 apresentou redução em 1,5 ciclos log e foi considerada sensível. *L. fermentum* KLD também apresentou redução na viabilidade, porém conseguiu recuperar sua viabilidade após 4h de contato. Quase todas cepas de bifidobactérias estudadas mantiveram sua viabilidade durante o tratamento simulado com suco entérico e foram consideradas intrinsecamente resistentes. Somente *B. adolescentis* 15703T apresentou uma progressiva redução na viabilidade e foi considerada sensível. *B. breve* 15700T também apresentou redução na viabilidade, mas houve recuperação após 4h de contato com suco entérico.

Embora lactobacilos estejam presentes em todas as porções do TGI, as regiões do íleo terminal e cólon parecem ser as preferenciais de colonização pelos lactobacilos e bifidobactérias, respectivamente. Nem todos os estudos

que avaliaram a tolerância de probióticos ao TGI consideraram este fato, e como resultado, pouco se sabe sobre a tolerância de probióticos à bile (KOS *et al.*, 2000).

Em relação aos resultados de resistência das cepas estudadas à bile e enzimas digestivas (Tabela 8 e 9) verificou-se que a presença de pepsina (3g/L), bile (10g/L) e pancreatina (1g/L) nos sucos gástrico e entérico simulados não influenciou a sobrevivência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL), após contato com suco gástrico simulado (pH 3) contendo ou não pepsina (3g/L).

Tempo de tratamento (min)	<i>L. casei</i> Shirota (log UFC/mL)		<i>L. casei</i> Lc01 (log UFC/mL)	
	com pepsina	sem pepsina	com pepsina	sem pepsina
0	9,43	9,58	9,54	9,59
15	9,53	9,61	9,93	9,66
30	9,45	9,51	9,73	9,84
60	9,37	9,81	9,89	9,34
120	9,38	9,36	9,67	9,59

Tabela 9. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL), após contato com suco entérico simulado (pH 8) contendo ou não bile (10g/L) e pancreatina (1g/L).

Tempo de tratamento (min)	<i>L. casei</i> Shirota (log UFC/mL)		<i>L. casei</i> Lc01 (log UFC/mL)	
	sem bile e pancreatina	com bile e pancreatina	sem bile e pancreatina	com bile e pancreatina
0	9,99	9,08	9,49	9,89
120	9,20	9,11	9,63	9,41
180	9,95	9,94	9,94	9,98
240	9,30	9,78	9,93	9,49

KOS *et al.* (2000) verificaram que a presença de oxgall (1,5 e 3mg/mL) no suco entérico diminuiu a sobrevivência de *L. acidophilus* M92, reduzindo sua população em 3 e 4,5 ciclos log, respectivamente. GILLILAND e SPECK (1977) também verificaram que bactérias não-intestinais, como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis* são muito sensíveis à bile, sendo que concentrações abaixo de 0,05% foram inibitórias. Ao contrário, bactérias probióticas foram bastante resistentes a oxgall (0,15-0,3%). Essa alta resistência à bile, verificada por esses autores foi confirmada no presente estudo para as culturas probióticas *L. casei* Shirota e Lc01.

O estresse gerado nos microrganismos pela bile é complexo e ainda não totalmente esclarecido, tendo em vista as diferentes concentrações biliares e

tempo de permanência em cada compartimento do trato gastrointestinal. Além disso, MARTEAU *et al.* (1997) observaram que o efeito bactericida da bile simulada é maior que a do suco biliar no organismo. Segundo esses autores, os sais biliares na bile simulada estão desconjugados, sendo mais deletérios para os microrganismos. Apesar de, em alguns trabalhos, a bile ter sido vista como fator limitante para sobrevivência dos probióticos, ZARATE *et al.* (2000), verificaram que o tratamento com sais biliares aumentou a atividade de β -galactosidase dos probióticos presentes em iogurte, auxiliando na digestão de lactose em pessoas deficientes de lactase.

Segundo NORIEGA *et al.* (2004), o aumento da resistência a bile em *Bifidobacterium* pode estar relacionada à grande capacidade deste microrganismo tolerar valores baixos de pH, tornando essa bactéria capaz de sobreviver no trato gastrointestinal. GOMEZ-ZAVAGLIA *et al.* (2002) reportaram mudanças nas propriedades da superfície de bifidobactérias ao entrar em contato com bile, verificando que esse contato pode induzir mudanças metabólicas irreversíveis nesses microrganismos.

Em relação à influência do leite na resistência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 às condições de estresse impostas pelo TGI, os resultados indicaram que o leite tem um efeito protetor a essas bactérias, pois se observou um aumento em sua capacidade de sobreviver ao tratamento com os sucos gástricos simulados, principalmente a aqueles com valores baixos de pH (Fig. 11, 12, 13 e 14).

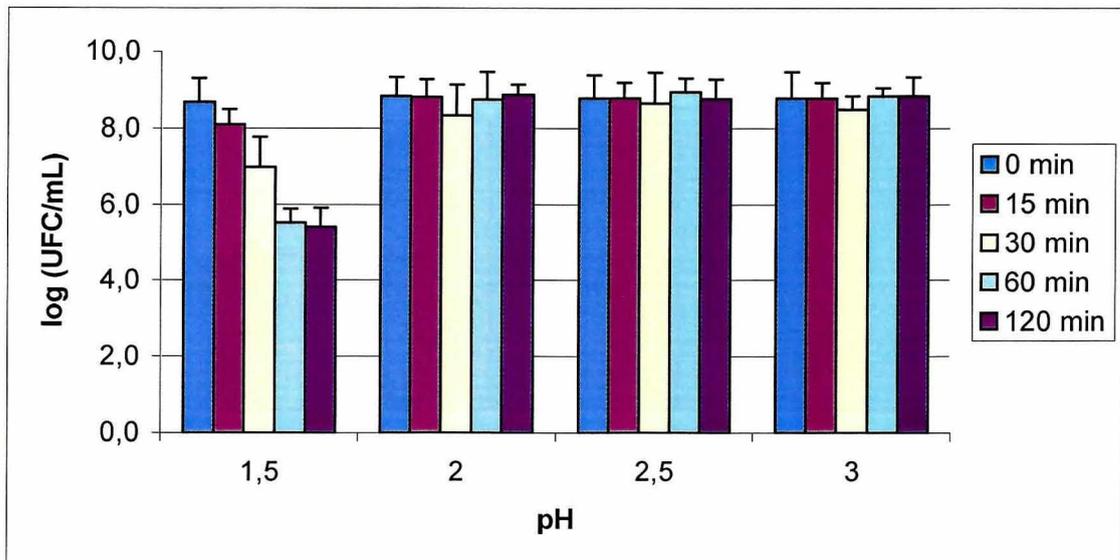


Figura 11. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por até 120min.

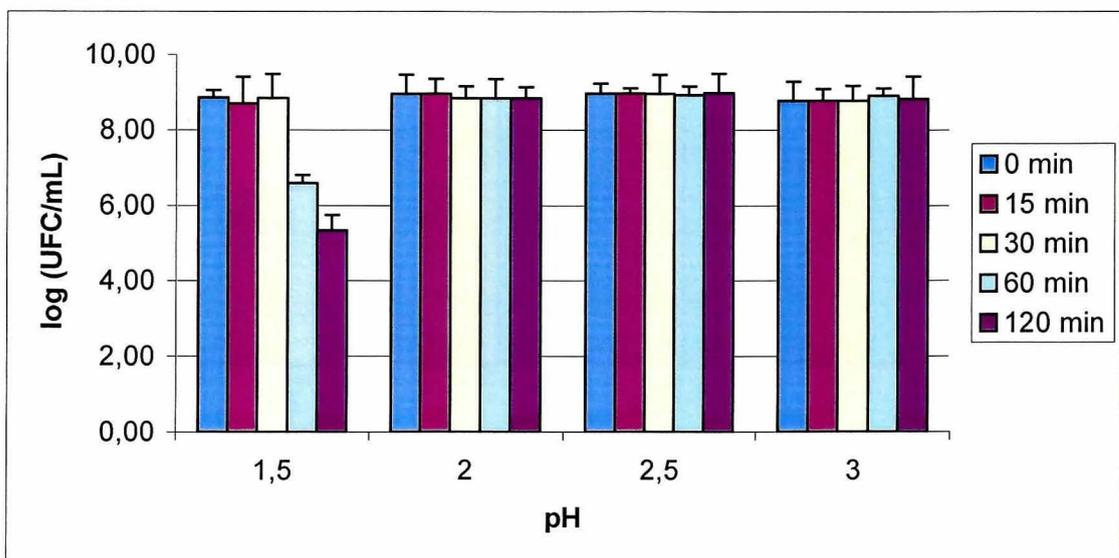


Figura 12. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por até 120min.

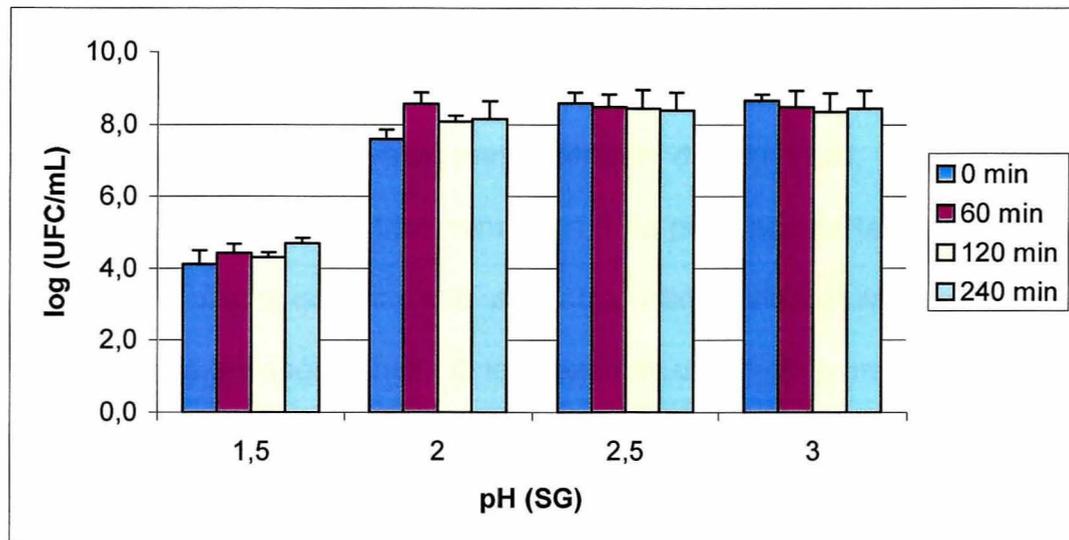


Figura 13. Contagens de *Lactobacillus casei* Shirota (log UFC/mL) após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min.

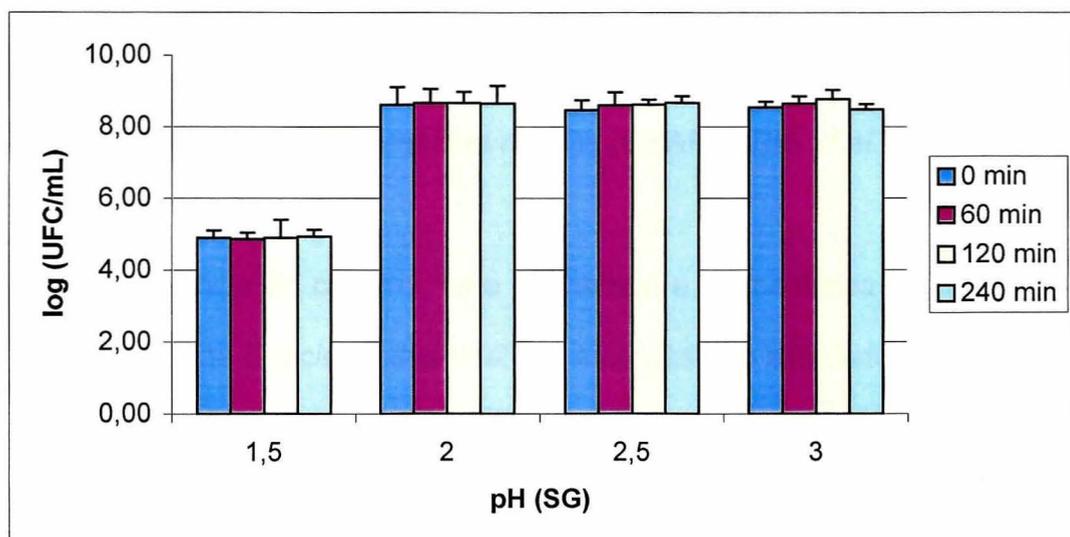


Figura 14. Contagens de *Lactobacillus casei* Lc01 (log UFC/mL), após contato com suco gástrico simulado com diferentes valores de pH, contendo leite, por 120min, seguido de contato com suco entérico simulado com pH 8,0 por até 240min.

Ao se comparar as Figuras 7 e 8 com as Figuras 11 e 12, é possível observar que a presença do leite retardou a perda de viabilidade das culturas probióticas expostas ao valor mais extremo de pH (1,5). A contagem de sobreviventes no suco gástrico com pH 1,5 na presença de leite foi de 5,4 log UFC/mL, ao passo que em sua ausência, não havia células sobreviventes nesse valor de pH após 30min. O leite exerceu um efeito protetor para *L. casei* Shirota e Lc01 quando em contato com suco gástrico com pH acima de 2,0, visto que não houve variação entre as contagens iniciais e após 120min de contato.

A presença de leite não causou mudança no valor do pH do suco gástrico. Dessa forma, uma maior sobrevivência das culturas probióticas não pode ser explicado por um pH mais favorável. Os resultados desse estudo confirmam aqueles apresentados por outros autores em relação ao efeito protetor de componentes presentes no leite (CHARTERIS *et al.*, 1998 b; KOS *et al.*, 2000).

A influência de caseína, leite desnatado e concentrado de proteínas na sobrevivência de *L. acidophilus* M92 no suco gástrico simulado com pH 2,0 foi estudada por KOS *et al.* (2000). Os autores observaram que no suco gástrico sem concentrado de proteínas, as contagens de sobreviventes reduziram em cerca de 6 ciclos log, e quando o concentrado de proteínas estava presente, essa redução foi de 4 ciclos log. Além disso, quando transferidos para o suco entérico (pH 8,0 contendo 3mg/mL de oxgall), a contagem aumentava mais 2 ciclos log, atingindo uma concentração final de 10⁶UFC/mL, correspondente à concentração que caracteriza um alimento probiótico.

CHARTERIS *et al.* (1998 b) fizeram estudos *in vitro* com *L. casei* 212.3 e *B. infantilis* 25962 através da exposição de uma suspensão celular destes microrganismos ao suco gástrico simulado (pH 2,0) contendo pepsina e cloreto de sódio, e suco intestinal simulado (pH 8,0) contendo pancreatina e cloreto de sódio. Os resultados mostraram que esses tratamentos causaram a perda da viabilidade celular da maioria das culturas testadas, sendo essa perda menor na presença de proteínas do leite. Dessa forma, os autores postularam que algumas culturas de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. conseguem sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal, quando ingeridas com produtos à base de leite. Entretanto mais estudos são ainda necessários para se compreender melhor a ação protetora dessas e de outras substâncias presentes no leite.

6. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos nesse trabalho, as seguintes conclusões são possíveis:

1. O ágar MRS foi eficiente para o cultivo de todas as culturas testadas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium animalis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), mas a suplementação com sais biliares, cloreto de lítio, propionato de sódio, cisteína, trealose, maltose, dicloxacilina e/ou gentamicina, aliada à utilização de condições adequadas de semeadura (profundidade e superfície) e de incubação (37°C, 42°C, aerobiose e anaerobiose), permite transformá-lo em meio seletivo para as diferentes espécies de bactérias lácticas e probióticas estudadas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium animalis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).
2. As contagens de *B. animalis* Bb12, *L. acidophilus* La05, *L. casei* Lc01 e *L. casei* Shirota nos ágares MRS, MRS 5,4, BL-MRS e LP-MRS foram semelhantes, porém foram observadas algumas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Assim:
 - para cultivo de *B. animalis* Bb12, recomenda-se a incubação em anaerobiose e semeadura em profundidade. A temperatura de incubação dos quatro meios testados não interfere nos resultados;

- para o cultivo de *L. acidophilus* La05, recomenda-se a utilização de ágar MRS 5,4, e incubação a 37°C. A forma de semeadura e a atmosfera de incubação não interfere nos resultados;
 - para o cultivo de *L. casei* Lc01, recomenda-se o emprego de ágar MRS 5,4. A forma de semeadura e condições de incubação (temperatura e atmosfera) não interferem nos resultados;
 - para o cultivo de *L. casei* Shirota, qualquer um dos ágar testados pode ser utilizado, recomendando-se a incubação a 37°C, independente da forma de semeadura.
3. A resistência de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 ao pH ácido é tanto maior quanto mais alto o pH. O modelo simulado utilizado indicou que o suco entérico é capaz de reverter a injúria induzida pelo suco gástrico, extremamente ácido, tornando os microrganismos cultiváveis;
4. O leite retarda a perda de viabilidade de *L. casei* Shirota e *L. casei* Lc01 nos pH mais ácidos, e exerce um efeito protetor para as culturas estudadas quando presente nos sucos gástricos com pH acima de 2,0.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, M. R.; SHAH, R.K. Selection of human isolates of Bifidobacteria for their use as probiotics. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, N.J., v. 102-103, n. 1-6, p. 81-98, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimento. Recomendações da Comissão já aprovadas pela Diretoria de Alimentos e Toxicologia; disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>; acesso em: 15/02/2005.

BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P.; ROIG, S. M. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Aliment. Acd. Sci. Hung.**, Budapest, v. 33, n. 2, p. 101-109, 2004.

BERRADA, N.; LEMELAN, J. F.; LAROCHE, P.; THOUVENOT, P.; PIAIA, M. *Bifidobacterium* from fermented milk: survival during gastric transit. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 74, n. 2, p.409-13, 1991.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 79, n. 1, p.8-15, 1996.

De acordo com NBR 6023 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1994.

- BORRIELO, S. P.; HAMMES, W. P.; HOLZAPFEL, W.; MARTEAU, P.; SCHEREZENMEIR, J.; VAARA, M.; VALTONEN, V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. **Clin. Infect. Dis.**, Munchen, v. 36, n. 6, p. 775-80, 2003.
- BOUHNİK, Y.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; ARLET, G.; GODEREL, I.; RAMBAUD, J-C. Faecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* species ingested in fermented milk. **Gastroenterology**, Orlando, F.L., v. 102, n. 3, p. 875-878, 1992.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999, do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2. Institui, junto à Câmara Técnica de Alimentos, Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. 1999 a.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999, do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 3 dez. 1999. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes. 1999 b.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 3 dez. 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. 1999 c.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 10 dez. 1999. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. 1999 d.

- CHARTERIS, W.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998 a.
- CHARTERIS, W.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, K. 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. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 84, n. 5, p.759-768, 1998 b.
- CHOW, J. Probiotics and prebiotics: A brief overview. **J. Ren. Nutr.**, New York, N.Y., v. 12, n. 2, p. 76-86, 2002.
- COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 147-56, 2004 a.
- COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J. P. *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 71, n. 4, p. 451-60, 2004 b.
- DALY, C.; DAVIS, R. The biotechnology of lactic bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. **Agric. Food Sci.**, Jokioine, v. 7, p. 219-250, 1998.
- DALY, C.; FITZGERALD, G.F.; O'CONNOR, L.; DAVIS, R. Technological and health benefits of dairy starter cultures. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p.195-205, 1998.

- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria*. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 79, n. 9, p. 1529-1536, 1996.
- DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 77, n. 10, p. 2854-2864, 1994.
- DRAGO, L.; GISMONDO, M.R.; LOMBARDI, A.; HAEN, C.; GOZZINI, L. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. **FEMS-Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 153, n. 2, p. 455-463, 1997.
- DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L.; COLOMBO, A.; GISMONDO, M. R. Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in Italy. **J. Chem. Res.**, London, v. 16, n. 5, p. 463-7, 2004.
- DROUVAULT, S.; CORTIER, G.; EHRLICH, S.D.; RENAULT, P. Survival, physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 65, n. 11, p. 4881-4889, 1999.
- DUNNE, 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. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 73, n. 2, p. 386S-392S, 2001.

- FANTAZZINI, L.; MAYER, M.D.B.; FRANCO, B.D.G.M. Avaliação da resistência ao suco gástrico de lactobacilos em leites fermentados. Trabalho não publicado, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2000.
- FERNANDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 449-55, 2003.
- FOOD INGREDIENTS. Leites fermentados com probióticos contribuem para uma vida mais saudável. **Food Ingredients**, São Paulo, Mai/jun, n. 6, p. 40-46, 2000.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 66, n. 5, p.365-378, 1989.
- GÄNZLE, M. G.; HERTEL, C.; VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M.; HAMMES, W. P. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 21-35, 1999.
- GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999 a.
- GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar

- cheese. **J. Agric. Food. Chem.**, Columbus, O.H., v. 47, n. 12, p.4907-4916, 1999 b.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **J. Food Prot.**, Des Moines, I.A., v. 40, n. 12, p. 820-823, 1977.
- GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 72, n. 10, p. 2483-2494, 1989.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of Bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 81, n. 1, p. 37-47, 1997.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 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 Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 10, p.139-157, 1999.
- GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; KOCIUBINSKI, G.; PEREZ, P.; DISAHRO, E.; De ANTONI, G. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 93, n. 5, p. 794-9, 2002.
- GUARNER, F.; SCHAAFSSMA, G.J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 237-238, 1998.

- GUYTON, A.C.; HALL, J. H. **Tratado de fisiologia médica**, 10^o ed., Guanabara Koogan, RJ: 2002.
- HOVE, H.; NORDGAARD-ANDERSEN, I.; MORTENSEN, P. B. Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. **Am. J. of Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 59, n. 1, p. 74-79, 1994.
- HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; SASSI, A. H.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 61, n. 2-3, p. 193-7, 2000.
- IDF. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin n^o 306**. Int. Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1995.
- INGHAM, S. C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodeacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in powdered nutritional products. **J. Food Prot.**, Des Moines, I.A., v. 62, n. 1, p. 77-80, 1999.
- ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 73, n. 6, p. 1142S-46S, 2001.
- KIM, H.S.; GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 66, n. 5, p. 959-966, 1983.
- KLAVER, F.A.M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Neth. Milk Dairy J.**, Amsterdam, v. 47, p. 151-164, 1993.

- KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technol. Biotechnol.**, Kaciceva, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2000.
- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Milchwissenschaft**, Postfach, v. 51, n. 8, p. 446-451, 1996.
- LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium chloride-sodium propionate agar for enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 75, n. 5, p. 1192-1196, 1992.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 6, p. 241-245, 1995.
- LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**, New York: John Wiley & Sons, 1999. 211p.
- LIM, K. S.; HUH, C. S.; BAEK, Y. J. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **J. Dairy. Sci.**, Savoy, I.L., v.78, n..10, p..2108-2112, 1995.
- LINDWALL, S.; FONDÉN, R. Passage and survival of *Lactobacillus acidophilus* in the human gastrointestinal tract. **IDF Bull. nº 21. Int. Dairy Fed.**, Brussels, Belgium, p. 179, 1984.
- MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS, J. H. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine:

- validation and the effects of bile. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 80, n. 6, p. 1031-1037, 1997.
- MARTEAU, P. R.; VRESE, M.; CELLIER, C. J.; SCHEREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 73, n. 2, p. 430S-6S, 2001.
- MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; LEPAGE, P.; DORE, J. Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. **Mini Rev. Med. Chem.**, Amsterdam, v. 4, n. 8, p. 889-96, 2004.
- MARTIN, R.; OLIVARES, M.; MARÍN, M. L.; FERNÁNDEZ, L. Probiotic potencial of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk . **J. Hum. Lact.**, Bethesda, M.D., v. 21, n. 1, p. 8-17, 2005.
- MATTILA-SANDHOLM, T. The PROBDEMO project: demonstration of the nutritional functionality of probiotic foods. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 10, p. 385-386, 1999.
- MATTILA-SANDHOLM, T., BLUM, S.; COLLINS, J.K.; CRITTENDEN, R.; de VOS, W.; DUNNE, C.; FONDÉN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, L.; OUWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; von WRIGHT, A. Probiotics: towards demonstrating efficacy. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 10, p. 393-399, 1999.
- MERCIER, G.; DUCHESNE, J.; CARLES-GIBERGUES, A. A simple and fast test to detect soils polluted by lead. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 118, n. 3, p. 285-296, 2002.

- MITSUOKA, T. Intestinal Bacteria and Health. **HARCOURT BRACE JOVANOVIČH**, Tokio, 1978, 208 p.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and immunity: Intestinal infection, allergies and cancer. **Yakult Honsha Co., Ltda**, Tokio, 1997, 128p.
- MODLER, H. W.; McKELLAR, R. C.; YAGUSHI, M. Bifidobacteria and **bifidogenic** factors. **Can. Inst. Food Sci. Technl. J.**, Ottawa, v. 23, p. 29-41, 1990.
- MONTALTO, M.; ARANCIO, F.; IZZI, D.; CUOCO, L.; CURIGLIANO, V.; MANNA, R.; GASBARRINI, G. Probiotics: history, definition, requirements and possible therapeutic applications. **Ann. Ital. Med. Int.**, Italy, v. 17, n. 3, p. 157-65, 2002.
- NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In NAIDU, A.S. **Nat. Food Antimicrobial Systems**, Wallingford, Boca Raton: CRC Press. 2000, 818 p.
- NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; SÁNCHEZ, B.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C. G. I. Effect on the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. **Int. J. Food. Microbiol.**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 79-86, 2004.
- NORIKATSU, Y.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TAGAMI, Y.; TANAKA, R.; OHWAKI, M.; MOROTOMI, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 51-57, 1999.

- NUTRITION AND HEALTH COLLECTION. Mecanismos of protection of the digestive tract. **John Libbey Eurotext**, Montrouge, 1998, 47p.
- NUTRITION AND HEALTH COLLECTION. Yoghurt: eighty years of active research for health. **John Libbey Eurotext**, Montrouge, 1999, 45p.
- NUTRITION AND HEALTH COLLECTION. Fermented foods an healthy digestive functions. **John Libbey Eurotext**, Montrouge, 2001, 47p.
- NUTRITION AND HEALTH COLLECTION. The intestinal microflora. **John Libbey Eurotext**, Montrouge, 2003, 47p.
- OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.
- PAYNE, J. F.; MORRIS, A. E. J.; BEERS, P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 353-358, 1999.
- PEDERSEN, L. W. Proposed methods for counting and discriminating between: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* and Bifidobacteria. **Research paper**, Chr. Hansen's Laboratory, Milwaukee, 1993.
- POCHART, P.; MARTEAU, P.; BOUHNİK, Y.; GODEREL, I.; BOURLIOUX, P.; RAMBAUD, J. C. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 55, n. 1, p. 78, 1992.

- REID, G. Minireview – The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 65, n. 9, p. 3763-3766, 1999.
- REID, G., BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microb. Infect.**, Amskidam, v. 4, n. 3, p. 319-324, 2002.
- REID, G. The importance of guidelines in the development and application of probiotic. **Curr. Pharm. Des.**, Sharjah, v. 11, n. 1, p. 11-6, 2005.
- ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 71, n. 2, p. 1682S-7S, 2000.
- ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. The fate of ingested lactobacilli in the proximal intestine. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 34, n. 4, p. 514-519, 1981.
- ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 7, n.12, p.785-793, 1997.
- ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 167-182, 2001.
- RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yogurts. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v. 50, p.51-57, 1995.

- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.
- SAKAI, K.; MISHIMA, T.; TACHIKI, T.; KUMAGAI, H.; TOCHIKURA, T. Mortality of bifidobacteria in boiled yogurt. **J. Ferm. Technol.**, Osaka, v. 65, p. 215-220, 1987.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; CUMMINGS, J. H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M. C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v. 80, n. 1, p. S147-71, 1998.
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt culture on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **J. Soc. Dairy Technol.**, London, v. 42, n. 2, p. 58-60, 1994.
- SANDERS, M.E. Probiotics – Scientific status summary. **Food Technol.**, Chicago, I.L., v. 53, n. 11, p. 67-77, 1999.
- SARTOR, R. B. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, Hagerstown, M.D., v. 21, n. 1, p. 44-50, 2005.
- SAS. **Statistical Analysis System**, versão 6.08. The SAS Institute, Cary, N.C., 1992.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 349-356, 1997.

- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.
- SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v. 55, n. 3, p. 139-144, 2000.
- SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA F. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 15, n.2, p.131-6, 2003.
- SREEKUMAR, O.; HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 83, n. 5, p. 931-39, 2000.
- STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 8, n. 5-6, p. 491-496, 1998.
- STANTON, C.; GARDINER, G.; MUHAN, H.; COLLINS, K. FITZGERALD, G. LYNCH, P.B.; ROSS, R.P. Market potential for probiotics. **Am. J. Clinical Nutr.**, Bethesda, M.D., v. 73, n. 6, p. 476-1835, 2001.
- SULLIVAN, G. C.; KELLY, P.; O'HALLORAN, S.; COLLINS, C.; COLLINS, J. K.; DUNNE, C.; SHANAHAN, F. Probiotics: an emerging therapy. **Curr. Pharm. Des.**, Sharjah, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2005.
- SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Probiotics and gastrointestinal diseases. **J. Int. Med.**, High St Worthing, v. 257, n. 1, p. 78-92, 2005.

- SUSKOVIC, J.; KOS, B.; MATOSIC, S.; BESENDORFER, V. The effect of bile salts on survival and morphology of potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, Dordrecht, v. 16, p. 673-678, 2000.
- SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 57-64, 1999.
- TEJADA-SIMON, M.V.; LEE, J.H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **J. Dairy Sci.**, Savoy, I.L., v. 82, n. 4, p. 649-660, 1999.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4.ed, São Paulo, Editora Atheneu, 2004, 718 p.
- TRINDADE, C.S.F. Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e avaliação da sua tolerância às secreções gastrintestinais. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- TOMAS, M. S.; BRU, E.; NADER-MACIAS, M. Statistical models to optimize production of probiotic characteristics. **Methods Mol. Biol.**, New York, N.Y., v. 268, p. 355-65, 2004.
- VANDAMME, F.; LEONOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J-C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydr. Polym.**, Amstredam, v. 48, p. 219-231, 2002.

- VANDERHOOF, J. A.; YOUNG, R. J. Current and potencial uses of probiotics. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, Arlington Heights, I.L., v. 93, n. 5, p. 33-7, 2004.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 497-505, 1999.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Res. Int.**, St Joseph, M.I., v..33, n..9, p..97-102, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid stater and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Res. Int.**, St Joseph, M.I., v. 36, p. 895-904, 2003.
- WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C.C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v. 93, n..2, p.209-17, 2003.
- ZARATE, G.; PEREZ-CHAIA, A.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. **J. Food Prot.**, Des Moines, I.A., v. 63, n. 9, p.1214-1221, 2000.

ZARATE, G.; GONZALEZ, S.; CHAIA, A. P. Assessing survival of dairy propionibacteria in gastrointestinal conditions and adherence to intestinal epithelia. **Methods Mol. Biol.**, New York, N.Y., v. 268, p. 423-32, 2004.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 8, n. 5-6, p.473-479, 1998.