

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE DOUTORADO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

LIDIANE BOTELHO
Farmacêutica
Mestre em Ciência de Alimentos

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LACTOBACILOS E
BIFIDOBACTERIAS EM ALIMENTOS PROBIÓTICOS DISPONÍVEIS
NO MERCADO BRASILEIRO**

**Campinas
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

B657i Botelho, Lidiane
Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias
em alimetos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro /
Lidiane Botelho. – Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Edir Nepomuceno da Silva
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lactobacilo .2. Bifidobacterias. 3. Probioticos. 4.
Ribotipagem. 5. Riboprinter. I. Silva, Edir Nepomuceno. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

LIDIANE BOTELHO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LACTOBACILOS E
BIFIDOBACTERIAS EM ALIMENTOS PROBIÓTICOS DISPONÍVEIS
NO MERCADO BRASILEIRO**

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Doutor
em Alimentos e Nutrição – Área de
Nutrição Básica Experimental e
Aplicada à Tecnologia de Alimentos**

**Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
Orientador**

**Campinas
2005**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Orientador

Prof. Dr. Carlos R. F. Grosso

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Membro

Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Membro

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Membro

Dra. Elza Teresinha Grael Marasca

Instituto de Tecnologia de Alimentos – TECNOLAT – ITAL

Membro Suplente

Dra. Neliane F. A Silveira

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Microbiologia – ITAL

Membro Suplente

Ao meu amado Airton, pelo amor e apoio, aos meus queridos pais Jane e Vicente, pelo incentivo e carinho, as minhas irmãs Érica e Cláudia e a meus sobrinhos Lincoln e João Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai pela vida e por todas as graças já concedidas.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Departamento de Alimentos e Nutrição e da Secretaria de Pós-Graduação em especial ao Cosme e Prof. Dra. Helena, pelo apoio e oportunidade de realização e finalização do curso.

Ao Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva, pela orientação e crédito na realização deste trabalho.

A Dra. Neusely da Silva, pelo total acompanhamento do trabalho, pelo seu carinho e ensinamentos, além da amizade ao longo desses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas/SP, por possibilitar a realização deste estudo.

Ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LENC) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo/SP, e a Suzane Silbert e Jussimara Monteiro pelos ensinamentos e por possibilitarem a realização das análises moleculares.

Aos amigos e colegas do Instituto de Tecnologia de Alimentos, centros de Química e Microbiologia, em especial a Cláudia, Rosana, Dionir, Gisela, Maristela, Gilca, Mirian, Juliano, Kamila, e a todos aqueles que me auxiliaram nos momentos de maiores dificuldades, pelo apoio, amizade e competente colaboração nas análises.

Aos meus amigos e companheiros de Americana (Famílias do Sr. Pedrão e José), Campinas (Air Liquide) e Nova Odessa (Sra. Josefina);

Aos membros da banca examinadora, que contribuíram para o aprimoramento do trabalho através das correções e sugestões, além da compreensão oferecida.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste sonho que se concretizou.

“As pessoas mais felizes não precisam necessariamente ter o melhor de tudo; elas apenas fazem o máximo de tudo o que aparece em seu caminho.”

RESUMO

No período de março a maio de 2001, várias culturas lácticas foram isoladas de 11 marcas de produtos contendo microrganismos vivos, comercializados na região de Campinas (SP). A amostragem incluiu 3 iogurtes, 5 leites fermentados, 2 bebidas lácteas e 1 mistura simbiótica em pó. As culturas foram identificadas por características fenotípicas e genotípicas. Foram também submetidas a testes para verificação do cumprimento dos pré-requisitos mínimos exigidos para culturas probióticas, que são resistência ao pH, resistência à bile e a produção de bacteriocinas.

Os resultados da identificação por características fenotípicas (36 culturas), feita utilizando-se o Kit de identificação API 50CHL (BioMérieux), mostraram as seguintes espécies: 1º) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* – isolado de 6 produtos, 2º) *Streptococcus thermophilus* – isolado de 4 produtos, 3º) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* – isolados de 3 produtos, 4º) *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* – isolados de 2 produtos cada, 5º) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* – isolados de 1 produto cada.

Os resultados da identificação por características genotípicas (41 culturas, 36 de produtos e 5 padrão de coleção de culturas), feita utilizando a técnica de ribotipagem automática Riboprinter (Dupont/Qualicon), mostraram os seguintes resultados: duas culturas não se mostraram tipáveis pelo Riboprinter (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* pelo API 50CHL). Cinco foram tipadas mas não identificadas pelo Riboprinter (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Lactobacillus acidophilus* pelo API 50CHL). Três foram identificadas como *Lactobacillus* apenas até o nível de gênero (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* pelo API 50CHL). As demais foram identificadas até o nível de espécie, 63% com o mesmo resultado do API 50CHL e 37% com resultados discordantes. A discordância concentrou-se nas culturas identificadas pelo API 50CHL como *Leuconostoc mesenteroides* (subsp. *cremoris* e *lactis*),

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As culturas com resultados concordantes concentraram-se naquelas identificadas pelo API 50CHL como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*., enquanto os discordantes concentraram-se naquelas identificadas pelo API 50CHL como *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Uma cepa de *Bifidobacterium bifidum* (KCTC 3440) foi corretamente identificada pelo Riboprinter e 1 cepa de *Bifidobacterium subtile* (ATCC 27537) foi erroneamente identificada como *Enterococcus faecium*.

Na avaliação da resistência ao pH, 36 culturas foram avaliadas e a maioria apresentou completa perda da viabilidade após 1 a 3 hora em pH 1,0 (25 culturas ou seja 69,4%) ou 2,0 (16 culturas ou seja 44,4%). Em pH 3,0 a taxa de sobrevivência foi maior. Dois critérios foram utilizados para a conclusão. De acordo com o primeiro, são consideradas como potencialmente probióticas as culturas que apresentam 80% de sobrevivência (menos de 0,1 reduções) após 3 horas de permanência em pH 3 ou 1% de bile. De acordo com esse critério, nenhuma das culturas isoladas pode ser considerada probiótica. De acordo com o segundo critério, a resistência em pH 3 por 90 minutos e na presença de 0,1% de bile (24h), sem redução na contagem de viáveis, indica culturas potencialmente probióticas. De acordo com esse critério, duas culturas se mostraram potencialmente probióticas, uma de *Lactobacillus rhamnosus* e uma de *Lactobacillus acidophilus*.

Na avaliação da resistência à bile, 29 culturas foram avaliadas e dois critérios utilizados para a conclusão. De acordo com o primeiro, culturas que apresentam taxa de 80% de sobrevivência (redução menor do que 0,1 log) na presença de 1,0% w/v de bile e pH 3,0 por 3 horas são resistentes. Segundo esse critério, nenhuma das 29 culturas isoladas de produtos mostrou resistência à bile. De acordo com o segundo, culturas que apresentem crescimento em presença de 1% de Ovgall, igual ou superior a 20% daquele obtido no controle, é considerada resistente (redução menor do que 0,7 log). Segundo esse critério, 24% ou seja, 7 das 29 culturas isoladas de produtos mostraram-se resistentes: uma cepa de

L.acidophilus, uma de *L.rhamnosus*, uma de *L.paracasei* subsp. *paracasei*, uma de *Streptococcus thermophilus*, uma de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e duas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*.

Na avaliação da produção de bacteriocinas, 32 culturas foram testadas, todas com resultados negativos. Na avaliação do antagonismo contra algumas espécies de bactérias patogênicas Gram negativas e Gram positivas, uma cepa de *L.rhamnosus* promoveu a inibição de *Listeria* e outra cepa de *L.rhamnosus* promoveu a inibição de *Listeria* e *S. aureus*. Não se observou inibição das bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella*).

ABSTRACT

In the period between March and May 2001, a series of lactic cultures were isolated from 11 different brand products purchased from regular retail outlets located in Campinas (SP, Brazil). The sample types collected included 3 yogurts, 5 fermented milks, 2 dairy beverages and 1 symbiotic dry mix. The strains were identified by phenotypic and genotypic characteristics, in addition to being submitted to tests to investigate whether they fulfill the minimum prerequisites for microorganisms to be considered probiotic, i.e. resistance to pH, resistance to bile and bacteriocin production.

Phenotypic identification (36 strains) using the API 50CHL Identification Kit (BioMérieux) evidenced the presence of the following species: 1^o) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* - isolated from 6 products, 2^o) *Streptococcus thermophilus* - isolated from 4 products, 3^o) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* - isolated from 3 products, 4^o) *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* - isolated from 2 products each, 5^o) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* - isolated from 1 product each.

Identification on the basis of genotypic characteristics (41 strains, 36 of which isolated from products and 5 standard strains from a culture collection) using an automated ribotyping method RiboPrinter® microbial characterization system, (Dupont/Qualicon) produced the following results: two strains could not be typed by the Riboprinter method (identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* by API 50CHL). Five strains were typed but not identified by the Riboprinter system (identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* by API 50CHL). Three strains were identified as *Lactobacillus* only to the genus level (identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by API 50CHL). The remaining strains were identified to the species level, 63% with the same results as those obtained with API 50CHL and 37% with discordant results. Most of the discordant results between the two

identification methods were generated by the strains identified by API 50CHL as *Leuconostoc mesenteroides* (subsp. *cremoris* and *lactis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The strains with concordant results were predominantly those identified by API 50CHL as *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, while the strains producing discordant results were mainly those identified by API 50CHL as *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. One strain of *Bifidobacterium bifidum* (KCTC 3440) was correctly identified by the Riboprinter system, whereas 1 strain of *Bifidobacterium subtile* (ATCC 27537) was incorrectly identified as *Enterococcus faecium*.

Most of the 36 strains evaluated for resistance to pH showed complete loss of viability after 1 to 3 hours at pH 1,0 or 2,0. At pH 3,0 the survival rate was considerably greater. Two criteria were used for drawing conclusions relative to the probiotic potential of the strains. According to the first criterion, strains exhibiting an 80% survival rate (reduction factor smaller than 0.1 log) after exposure for 3 hours to pH 3 or 1% bile. Based on this criterion, none of the strains isolated could be considered probiotic. According to the second criterion, resistance to pH 3 for 90 minutes and in the presence of 0,1% bile (24h), without reduction in viable counts, indicates potentially probiotic strains. Based on this latter criterion, two strains were found to exhibit probiotic potential, one strain of *Lactobacillus rhamnosus* and another of *Lactobacillus acidophilus*.

A total of 29 strains were evaluated for bile resistance and the conclusions of the test results produced were based on two different criteria. According to the first, strains presenting an 80% survival rate (reduction factor smaller than 0,1 log) after 3 hours exposure to 1,0% w/v bile and pH 3,0 are considered resistant. Based on this criterion, none of the 29 strains isolated was found to be resistant to bile. According to the second criterion, cultures presenting growth in the presence of 1% Ovgall, equal or greater than 20% of that produced by the control, are considered resistant (reduction factor smaller than 0,7 log). Based on this criterion, 7 (24%) of the 29 strains isolated from products were found to be resistant: one strain of

L.acidophilus, one of *L.rhamnosus*, one of *L.paracasei* subsp. *paracasei*, one of *Streptococcus thermophilus*, one of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and two strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*.

Thirty-two strains were tested for bacteriocin production, all of which gave negative results. The results of the test performed to evaluate antagonism against some species of Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria showed that one strain of *L.rhamnosus* inhibited *Listeria*, while another strain of *L.rhamnosus* inhibited both *Listeria* and *S. aureus*. No inhibition of Gram-negative bacteria (*E. coli* e *Salmonella*) was found.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Ecologia microbiana do trato gastrointestinal humano e vantagens fornecidas por uma microbiota benéfica.....	6
2.2 Produtos carreadores de bactérias probióticas e microrganismos empregados em sua formulação.....	8
2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL) e sua relação com os probióticos.....	13
2.3.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	15
2.3.1.1 Características bioquímicas e fisiológicas dos lactobacilos.....	16
2.3.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i>	17
2.3.2.1 Características bioquímicas e fisiológicas das bifidobactérias.....	19
2.4 Métodos e meios de isolamento de lactobacilos e bifidobactérias e controle de qualidade dos produtos.....	21
2.5 Legislação e rotulagem: discrepâncias encontradas nos rótulos de alguns alimentos probióticos.....	25
2.6 Metodologias para a identificação fenotípica.....	29
2.6.1 Métodos culturais de identificação para lactobacilos e bifidobactérias.....	31
2.7 Estudo taxonômico das bactérias ácido lácticas probióticas e análise de agrupamento.....	36
2.7.1 Taxonomia numérica.....	36
2.7.2 Taxonomia polifásica.....	38
2.7.3 Aspectos taxonômicos e mudanças observadas no gênero <i>Lactobacillus</i>	38
2.7.3.1 Grupos <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. delbrueckii</i>	39
2.7.4 Análise de agrupamento.....	41

2.8 Métodos moleculares de identificação e classificação.....	42
2.9 Filogenia.....	44
3.0 Tipagem molecular e características dos métodos de tipagem.....	48
3.1 Principais métodos moleculares para identificação, classificação e geração de fingerprints utilizados para bactérias ácido lácticas.....	51
3.1.1 Análise de restrição enzimática.....	52
3.1.2 RFLP.....	52
3.1.3 PFGE.....	54
3.1.4 PCR.....	56
3.1.4.1 Multiplex-PCR.....	58
3.1.4.2 RAPD-PCR.....	59
3.1.4.3 Triplet-RAPD.....	61
3.1.5 Ribotipagem.....	61
3.1.5.1 Ribotipagem automatizada.....	65
3.1.5.2 Trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a ribotipagem automatizada.....	67
3.2 Classificação de microrganismos com propriedades probióticas e importância das culturas <i>startes</i>	68
3.2.1 Conceito Probióticos.....	68
3.2.2 Pré-requisitos que devem ser observados para que o microrganismo possa ser considerado probiótico.....	72
3.2.3 Alegação funcional.....	79
3.2.4 Bacteriocinas e ação antimicrobiana.....	81
3 OBJETIVOS.....	83
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
4.1 Isolamento e identificação fenotípica das culturas.....	84
4.1.1 Amostragem.....	84
4.1.2 Isolamento das culturas.....	85
4.1.3 Culturas padrão.....	87

4.1.4	Manutenção das culturas.....	88
4.1.5	Reativação das culturas para uso no trabalho.....	89
4.1.6	Teste da F6PPK.....	89
4.1.7	Identificação obtida por meio das galerias do API 50 CHL e 20 A das culturas.....	91
4.2	Identificação molecular por ribotipagem das culturas.....	91
4.2.1	Preparo das culturas para o ensaio.....	92
4.2.2	Ribotipagem usando o equipamento Riboprinter.....	92
4.3	Avaliação do cumprimento de pré-requisitos mínimos para a classificação das culturas isoladas como probióticas.....	94
4.3.1	Teste de resistência ao pH.....	94
4.3.2	Teste de tolerância a bile.....	94
4.3.3	Detecção da produção de bacteriocinas.....	95
4.3.4	Teste de antagonismo contra bactérias patogênicas.....	95
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
5.1	Caracterização inicial das culturas isoladas.....	97
5.2	Identificação das culturas isoladas pelo API 50 CHL.....	101
5.3	Identificação das culturas padrão pelo Kit API 50CHL e 20 A.....	107
5.4	Análise de agrupamento das culturas.....	111
5.5	Identificação das culturas pelo Riboprinter.....	112
5.5.1	Ribogrupos.....	112
5.5.2	Comparação entre a identificação pelo Kit API 50 CHL e o Riboprinter.....	115
5.6	Teste de resistência ao pH.....	120
5.7	Teste de tolerância à bile.....	127
5.8	Teste de produção de bacteriocinas.....	131
5.9	Teste de antagonismo contra bactérias patogênicas.....	134
6.	CONCLUSÕES FINAIS.....	137
6.1	Caracterização fenotípica das culturas.....	137
6.2	Caracterização molecular das culturas.....	140

6.3 Pré-requisitos mínimos e observações de rotulagem dos produtos brasileiros.....	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
8. ANEXOS.....	205
Anexo A – Formulação e preparação dos meios de cultura e reagentes utilizados para o isolamento, manutenção e reativação das culturas isoladas das amostras e padrão.....	206
Anexo B – Meio de cultura, reagentes e concentrações utilizados para o teste da F6PPK.....	212
Anexo C – Relação das culturas isoladas, suas características morfológicas, meios de cultura utilizados no isolamento e características do produto fornecido pelo fabricante.....	214
Anexo D – Fotos mostrando estrias e as unidades formadoras de colônias de algumas culturas nos diferentes meios de cultura utilizados no isolamento.....	219
Anexo E – Coloração de Gram e aspectos morfológicos das culturas isoladas ao microscópio.....	220
Anexo F – Gráficos de resistências ao pH de culturas padrão.....	226

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, pesquisas têm demonstrado que certos alimentos possuem função metabólica e regulatória na fisiologia do organismo, através do qual fornecem benefícios além da nutrição básica. Esses alimentos, conhecidos como alimentos funcionais, constituem um segmento da indústria alimentícia com ampla expansão no mercado do Japão, Europa e EUA. A tendência do consumidor em buscar produtos mais saudáveis tem aberto novos nichos de mercado para as indústrias alimentícias e de bebidas. Uma categoria que tem-se mostrado bastante promissora no mercado brasileiro para os laticínios são os lácteos frescos, como leites fermentados, iogurtes, bebidas lácteas e queijos frescos. Muitos estudos têm mostrado que o consumo de leites fermentados promove diversos benefícios à saúde (Le *et al.*, 1986; Van't Veer *et al.*, 1989; Modler 1990; Hughes & Hoover 1991; Kanbe 1992; Mital & Garg 1992; Nakazawa & Hosono 1992; Yamamoto *et al.*, 1994). Estas vantagens provavelmente vêm, em primeiro lugar, à partir da viabilidade dos microrganismos ingeridos, os quais induzem a mudanças e influências positivas sobre o ambiente intestinal (Deeth & Tamime 1981; IDF 1984) e, em segundo, dos metabólitos produzidos no leite fermentado (Saboya *et al.*, 1997).

O trato digestivo dos seres humanos e outros animais contém uma grande coleção de microrganismos, a maioria bactérias que formam a microbiota normal de indivíduos sãos. Grande parte dos membros desse complexo ecossistema tem uma função metabolicamente ativa no hospedeiro, havendo uma série de

características fisiológicas, bioquímicas e imunológicas do organismo que são, na verdade, associadas à presença dessa comunidade (Luckey 1963, Gordon & Pesti 1971). Alguns exemplos destacados por Tannock (1998a) e que têm forte influência sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro incluem o metabolismo dos ácidos biliares, o rendimento cardíaco e a utilização de oxigênio, a concentração de colesterol no soro sanguíneo, a concentração de gama-globulinas no sangue, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, o controle do pH intestinal, a composição dos gases intestinais e a velocidade de trânsito do conteúdo intestinal.

Dentre as bactérias que compõem a microbiota intestinal normal dos indivíduos humanos, dois grupos têm-se revelado particularmente envolvidos nesses fenômenos, as espécies do gênero *Bifidobacterium* e as espécies do gênero *Lactobacillus*. Em função de seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, essas bactérias têm sido chamadas de funcionais e estão envolvidas no desenvolvimento de uma classe de produtos com um grande potencial de mercado na indústria de alimentos nacional e internacional - os probióticos, prebióticos e simbióticos, que de modo geral, constituem-se como estratégias dietéticas para o aumento dos microrganismos benéficos da microbiota intestinal.

Os probióticos, definidos como alimentos ou suplementos alimentares contendo lactobacilos e/ou bifidobactéria viáveis, quando administrados na dieta, colonizam o intestino, promovem um balanceamento entre as diferentes espécies naturais e garantem uma população funcional capaz de promover efeitos

desejados sobre o metabolismo do organismo (Gibson & Roberfroid 1995). Os microrganismos são geralmente carregados na forma viável em produtos lácteos fermentados ou não, no entanto, a incorporação destes microrganismos em alimentos ainda é limitada pelo fato de que estes normalmente não contribuem beneficemente para a qualidade sensorial do produto. Também há dúvidas a respeito da sua sobrevivência nos alimentos, uma vez que ainda não existem métodos certificados para a contagem e identificação, além da extrema sensibilidade desses microrganismos a uma série de fatores como presença de oxigênio, outras culturas e pH baixo (Trindade 2001).

No mercado nacional e internacional encontra-se hoje uma série de produtos contendo células vivas dessas bactérias, porém, na avaliação desses alimentos é importante considerar que nem todos microrganismos são necessariamente probióticos. Na realidade, apenas poucas culturas, dentre algumas espécies desses dois gêneros, atendem aos pré-requisitos para receber tal classificação. Ainda assim, a maioria dos fabricantes, no Brasil e em outros países, destaca em rótulo a presença de lactobacilos e/ou bifidobactérias viáveis em seus produtos, sem, no entanto, discriminar qual ou quais espécies estão presentes. Um fator adicional a ser discutido é o fato de a classificação e nomenclatura destes microrganismos ter sofrido uma série de mudanças nos últimos anos, de forma que, mesmo nos casos em que a identidade das culturas é declarada, nem sempre a nomenclatura usada em rótulo corresponde à nomenclatura oficial corrente. Muitos iogurtes são rotulados contendo por exemplo o microrganismo *L. acidophilus*, no entanto, em decorrência destas

reclassificações do grupo, as informações encontradas nos rótulos estão incorretas (Hammes & Vogel 1995). A produção de probióticos no mercado envolve uma série de passos graduais que necessitam ser monitorados para se obter uma correta rotulagem, funcionalidade e segurança dos produtos. Quando o produto não é rotulado corretamente, sua segurança e funcionalidade não podem ser garantidos devido à deficiência de documentação dos componentes do produto (Sanders e Huis In't Veld 1999; Saarela *et al.*, 2000). No entanto, como muitos fabricantes somente debatem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) dos lactobacilos e bifidobacterias (Salminen *et al.*, 1998a), a caracterização das culturas ácido lácticas probióticas com respeito ao status taxonômico, resistência a antibiótico e virulência são negligenciados. Do ponto de vista para agentes reguladores de saúde, no entanto, a rotulagem dos produtos deve refletir exatamente a composição das espécies (Tannock 1999a). Maior ênfase deve ser dada ao desenvolvimento de métodos rápidos e acurados na identificação das espécies de lactobacilos e bifidobacterias. Os estudos que objetivam por exemplo a detecção da prevalência destas espécies na microflora intestinal humana, devem ser iniciadas desde que os métodos de identificação sejam satisfatórios. Companhias que comercializam culturas para a indústria de laticínios e outros fabricantes de probióticos devem garantir que as culturas de suas coleções de cultura sejam identificadas pelos procedimentos genéticos e que possuam sua nomenclatura de acordo com a oficial corrente (Tannock 1999a). Segundo Tynkkynen *et al.* (1999), a identificação de lactobacilos é importante para seu uso industrial. A indústria biotecnológica necessita de ferramentas de monitorização no uso de culturas patenteadas ou distinção de culturas probióticas de isolados

naturais do trato gastrointestinal do hospedeiro. No aspecto de segurança é crucial que a identificação seja capaz de comparar isolados clínicos e culturas biotecnológicas e também monitorar a estabilidade genética destas culturas (Donohue & Salminen 1996; Klein *et al.*, 1998).

No Brasil, os dados encontrados na literatura para produtos lácteos mencionam contagens totais de bactérias viáveis, sem especificar, no entanto, a espécie ou as espécies existentes (Barreto *et al.*, 2002). A maioria dos produtos comercializados ainda não contém ou não declaram a presença de culturas probióticas de maior interesse, como *L. casei*, *L. acidophilus* e bifidobactérias, predominando os iogurtes e leites fermentados produzidos com fermentos lácticos e *Lactobacillus* sp tradicionais, ou quando contêm, a nomenclatura destas culturas não correspondem com a oficial corrente, prejudicando ainda mais o estabelecimento da alegação funcional destes produtos. Para a inclusão de culturas probióticas, Barreto *et al.* (2002), mencionam que a legislação brasileira deve estabelecer valores limite mínimos de contagem e implantar métodos diferenciais de quantificação e qualificação das espécies de maior interesse, visto que somente este tipo de metodologia é que pode garantir uma correta identificação e assegurar a funcionalidade das culturas como benéficas à saúde.

Em decorrência do aumento do número de produtos existentes no mercado alegando aspectos funcionais, pelas mudanças na nomenclatura e classificação dos lactobacilos e bifidobactérias após as constantes evoluções moleculares e pela falta de metodologias padrão e controle de qualidade para os produtos probióticos brasileiros, o presente trabalho tem por objetivos:

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ECOLOGIA MICROBIANA DO TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO E VANTAGENS FORNECIDAS POR UMA MICROBIOTA BENÉFICA

A comunidade microbiana que habita o trato gastrointestinal de um indivíduo é caracterizada por sua densidade populacional elevada, diversidade ampla e interações complexas (Mackie *et al.*, 1999). Ela representa um ecossistema contendo cerca de 100 trilhões de bactérias e composta por mais de 400 diferentes espécies (Cummins e Macfarlane 1991), sendo ainda limitado o entendimento deste sistema e de suas interações (Holtzapfel *et al.*, 1998).

O trato gastrointestinal apresenta uma área de contato muito extensa, onde a mucosa intestinal possui vilosidades e microvilosidades que resultam numa superfície de cerca de 150-200m², que fornece o espaço necessário para interações durante o processo digestivo e para adesão bacteriana à parede da mucosa e concomitante colonização (Holtzapfel *et al.*, 1998). A microbiota gastrointestinal pode ser considerada como um órgão do corpo humano que é rapidamente renovável e metabolicamente adaptável (Mackie *et al.*, 1999).

O intestino grosso humano é a região mais densamente colonizada do trato digestivo. Pelo menos 50 gêneros diferentes de bactérias residem no cólon, compreendendo centenas de espécies individuais (Gibson 1998), sendo que a grande maioria desses microrganismos são anaeróbios estritos tais como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Eubacterium*. Estes microrganismos convivem em relação simbióticas ou antagônicas, crescendo nos componentes de alimentos que são ingeridos ou nas secreções do trato intestinal do hospedeiro (Mitsuoka 1992). Através do processo de fermentação, as bactérias do cólon são capazes de produzir uma grande variedade de compostos que têm variados efeitos na fisiologia intestinal, assim como outras influências sistêmicas.

As bactérias endógenas não são distribuídas aleatoriamente ao longo do trato gastrointestinal, mas ao contrário, são encontradas distribuídas, de acordo com as espécies e densidade populacional, em regiões específicas do trato

(Mackie *et al.*, 1999). Esta distribuição por sua vez ocorre em função das condições de cada região do trato, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, fatores químicos e físicos. Assim, no estômago, pela presença do pH gástrico o número de bactérias ácido-tolerantes é de $10^2 - 10^3$ por mL, sendo encontrados somente habitantes naturais como *Lactobacilli*, leveduras e bactérias da boca e do alimento ingerido (Mitsuoka, 1978). No duodeno ou parte superior do intestino delgado, as bactérias não crescem bem, devido a fatores químicos como o suco biliar liberado, lisozima, muco secretado pela mucosa intestinal, e fatores físicos como os movimentos peristálticos, portanto, as bactérias encontradas nessa área limitam-se a *Streptococcus*, *Lactobacillus*, leveduras e *Veillonella*, em níveis de 10^4 UFC/g. No jejuno e íleo (parte inferior do intestino), o número de bactérias aumenta rapidamente, devido à neutralização do suco biliar e à redução da velocidade de trânsito do alimento, sendo encontrado $10^5 - 10^7$ UFC/g de bactérias, mesmo quando vazio. Nesta região são encontrados *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Streptococcus*. No ceco, a velocidade de trânsito é repentinamente reduzida e o número total de bactérias aumenta abruptamente a níveis de 10^{10} UFC/g de conteúdo. Essas bactérias colonizam o intestino grosso, utilizando o conteúdo proveniente do intestino delgado como meio de crescimento e a microbiota assemelha-se à das fezes.

Visto que a microbiota intestinal é composta por diferentes espécies bacterianas, isso implica na conversão de várias substâncias que produzem tanto produtos benéficos como nocivos para o hospedeiro (Mitsuoka 1996). Algumas vitaminas e proteínas são sintetizadas por algumas bactérias intestinais e são parcialmente absorvidas e utilizadas pelo hospedeiro. As bactérias endógenas protegem o hospedeiro contra infecções por patógenos exógenos, inibindo o crescimento desses microrganismos pela produção de ácidos orgânicos, particularmente ácidos graxos de cadeia curta e pela produção de bacteriocinas. Bactérias benéficas, como bifidobactérias, inibem a proliferação de bactérias nocivas e agem como protetores do intestino grosso. Além disso, compostos produzidos por algumas bactérias benéficas, podem estimular o sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, a microbiota intestinal propicia efeitos

favoráveis à saúde do hospedeiro (Mitsuoka 1990). Assim, hoje em dia torna-se difícil deixar de apreciar as evidências dos aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica e seu metabolismo, e particularmente o papel desse ecossistema na nutrição e saúde do hospedeiro (Holtzapfel *et al.*, 1998; Gibson e Williams 1999; Mackie *et al.*, 1999).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* fazem parte da microbiota benéfica do intestino delgado e grosso, respectivamente. A re-introdução destes grupos microbianos no hospedeiro é feita por meio da administração de probióticos que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora do balanço da microbiota intestinal (Fuller 1989).

2.2. PRODUTOS CARREADORES DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E MICRORGANISMOS EMPREGADOS EM SUA FORMULAÇÃO

O consumo de leites fermentados remonta à história escrita, tendo sido inclusive, citado na Bíblia como alimento usado para oferecimento de Abraão a Deus ou a visitas ilustres. No entanto, somente após a II Guerra Mundial é que os leites fermentados, principalmente o iogurte, passaram a ser produzidos em escala industrial, conquistando grande parte da população mundial. Por outro lado entretanto, desde o início de 1907, o microbiologista Elie Metchnikoff (Metchnikoff 1908), propôs uma teoria que o consumo diário de grandes quantidades de leites fermentados prolongaria a vida, muitos pesquisadores têm se empenhado no estudo dos microrganismos empregados na elaboração de produtos lácteos e no efeito destes sobre os homens e animais.

A manipulação da microbiota endógena do trato gastrointestinal vem sendo correntemente empregada como uma medida de introdução de novos microrganismos ao trato (Driessen e DeBoer 1989; Hitchins e McDonough 1989), para isto os bioprodutos alimentares tem sido empregados e são usados como veículos carreadores destes microrganismos probióticos. Esses bioprodutos também chamados de produtos lácteos de terceira geração, incluem os leites fermentados (Tamine e Robinson 1988; Mital e Carg 1992), iogurtes (Reuter

1990), iogurtes frescos (gelados) (Holcomb *et al.*, 1991; Modler e Villa-Garcia 1993; Richardson 1996; Laroia e Martin 1991a), queijo cheddar (Dinakar e Mistry 1994; Roy *et al.*, 1995), queijo cottage (Blanchette *et al.*, 1995), sorvetes (Modler *et al.*, 1990b; Hekmat e McMahon, 1992), leite de soja fermentado (Valdez e Giori 1987, 1993), leite de soja (Murti *et al.*, 1992), entre outros.

A contribuição das bactérias do iogurte na melhora da microbiota intestinal tem sido vastamente reconhecida. A incorporação de *L. acidophilus* e *B. bifidum* nos iogurtes geram produtos de excelente valor terapêutico (Tamine e Robinson 1985). Um consumo regular de iogurte (400 – 500g/semana) contém $1,0 \times 10^6$ UFC/g de *Bifidobacterium* sp. e *L. acidophilus*, estes por sua vez deverão sobreviver à passagem pelo trato intestinal para que possam oferecer seus efeitos terapêuticos benéficos (Tamine *et al.*, 1995)

As espécies mais freqüentemente empregadas na produção dos produtos probióticos do leite são de origem intestinal humana pois geralmente são mais facilmente toleradas e mais adaptadas as necessidades fisiológicas do hospedeiro e podem mais facilmente colonizar o intestino do que culturas originárias do cólon de outros animais. As culturas natas incluem *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *ramnosus* e *Enterococcus faecium* (Kurmman 1998; Hoier 1992a). Resultados recentes com culturas de *B. longum* como adjunto dietético de produtos de leite com *B. adolescentis* e *B. infantis* tem sido considerados uma alternativa adequada (Martin 1996).

Muitos produtos recentemente desenvolvidos em todo o mundo contêm uma mistura de culturas de bifidobactérias e bactérias acidoláticas. Estas culturas mistas são formadas pelos microrganismos *Bifidobacterium bifidum*, *L. acidophilus* e *Streptococcus thermophilus*, ou uma combinação de *L. acidophilus* e *B. bifidum*. Outras combinações encontradas apresentam *B. infantis* e *B. longum*. As culturas mistas que apresentam *L. acidophilus* e *B. bifidum* são as mais utilizadas, pois uma simbiose entre estes microrganismos permite uma maior velocidade de crescimento e um melhor aroma do produto terminado (Manzanares 1997).

Os iogurtes com culturas de *L. acidophilus* (incluindo-se espécies relacionadas como *L. crispatus* e *L. johnsonii*), *L. casei*, *L. paracasei* e

Bifidobacterium sp são predominantes (Holtzapfel *et al.*, 1998). Propriedades funcionais e de segurança das culturas *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* tem sido extensivamente estudadas e documentadas na literatura (Salminen *et al.*, 1998b).

O *L. reuteri* tem grande interesse nos probióticos produtores de bacteriocinas e é usado na nutrição animal e também em produtos de iogurte e preparações farmacêuticas (Casas e Dobrogosz 1996; Dobrogosz e Casas 1996).

O primeiro produto contendo bactéria bífida foi produzido na Alemanha em 1948 porém, as dificuldades no estabelecimento de protocolos para isolamento, identificação, produção e manutenção destas bactérias contribuíram para a descontinuidade, naquela época, na evolução de produtos semelhantes. Os maiores problemas com bactérias bífidas em laticínios são as suas características de anaerobiose e exigências de grande porcentagem de inóculo, em torno de 10% (Ferreira 1996). Atualmente, produtos fermentados com bifidobacterias de origem animal têm sido reportados, essas culturas são mais facilmente cultivadas e podem resistir às condições adversas durante a produção industrial, como baixo pH e presença de níveis baixos de oxigênio. Recentemente, a cultura *B. lactis*, tem sido considerada como promissora, pois possui boa tolerância ao oxigênio e ao ácido (Gomes *et al.*, 1998a e Gomes *et al.*, 1998b)

Na Europa e Austrália, iogurtes contendo *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. são referidos como iogurtes “AB” e a incorporação de *L. casei* ao produto é denominado iogurtes “ABC”. Tradicionalmente, iogurtes fabricados com *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (culturas *startes*), apesar de oferecerem benefícios à saúde, não são de origem natural do intestino, deste modo, para que o produto possa ser considerado probiótico, culturas de *L. acidophilus* e bifidobactéria (e *L. casei* ou ambas) devem ser incorporados como adjuntos dietéticos (Shah 2000). Diferentes espécies e culturas são correntemente usadas nos produtos europeus (Salminen *et al.*, 1997; Tamine e Marshall 1997; Anon 1997; Obermann e Libudzisz 1988; Knorr 1998) incluindo *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* biovar *diacetyllactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B.*

brevis, *B. infantis*, *B. animalis*, *S. thermophilus* os quais apresentam benefícios funcionais (Salminen *et al.*, 1998c). Na Alemanha os produtos contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum* são conhecidos como iogurtes “mild” ou bio-iogurtes. A maioria dos novos produtos probióticos contém culturas de *L. acidophilus* ou espécies finamente relacionadas (chamadas de grupo *L. acidophilus*). Culturas chamadas de grupo *L. casei* compreendem as espécies *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans* e *L. rhamnosus* têm sido utilizados na fabricação de iogurtes.

Os probióticos são comercializados na forma de preparações contendo um único ou uma combinação de microrganismos, onde deve-se apresentar viável na preparação e manter essa viabilidade no ecossistema digestivo, condição indispensável para a sua atuação (Penna *et al.*, 2000). Podem ainda ser comercializado na forma de preparações farmacêuticas em cápsulas ou sachês, pós, tabletes, suspensões líquidas e secas (Fooks *et al.*, 1999). Em produtos liofilizados a manutenção da viabilidade durante longo período de armazenamento em temperatura ambiente são obtidos, o que não é possível para os produtos fermentados do leite, onde a refrigeração é indispensável, e o tempo de vida dos microrganismos é reduzido (Fuller 1992).

Além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde que proporcionam, os microrganismos probióticos podem também contribuir para melhorar o sabor do produto final, possuindo a vantagem de promover uma acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento (Gomes e Malcata 1998d). Atualmente no mercado mundial estão disponíveis mais de 100 produtos diferentes contendo bactérias bífidas, e cerca de 50 indústrias de laticínios estão comercializando produtos bífido-acidophilus, os quais são produzidos essencialmente no Japão e Europa (Gomes e Malcata 1998c; Ferreira 2003). Nos mercados japonês e europeu, a tendência é utilizar novas estirpes probióticas e misturas mais complexas. Em outros mercados, como nos EUA e Brasil, a maioria dos produtos probióticos contêm estirpes de *L. acidophilus* e de *Bifidobacterium* sp. Tem-se observado, no entanto, o crescimento de produtos com outras estirpes probióticas das espécies *L. casei* e *L. rhamnosus*.

Em qualquer um dos gêneros (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), as espécies correntemente utilizadas ao nível tecnológico não são consideradas patogênicas, gozando do *status* GRAS (Generally Recognised As Safe). O isolamento destes microrganismos de infecções tem sido reportados com baixa incidência, e associados com pacientes imunocomprometidos (Brook 1996; Saxelin *et al.*, 1996).

Apesar da veemente comercialização dos produtos probióticos no Brasil e no mundo, a sobrevivência das culturas deixa dúvidas e gera muitas controvérsias, uma vez que algumas culturas desses microrganismos são extremamente sensíveis a uma série de fatores como acidez, presença de oxigênio e outras culturas. Um outro problema é a dificuldade e ausência de padronização de métodos para identificação e contagem dessas culturas. A indústria de produtos funcionais é peculiar, e a colocação desses produtos no mercado, devidamente rotulados, implica não só em domínio de tecnologia, mas de ciência. A comprovação dos benefícios desses produtos deve ser documentada, e essas informações devem estar disponíveis para as organizações governamentais, para a indústria e para os consumidores. De acordo com Short (1999a), em geral, o conhecimento dos consumidores para os alimentos potencialmente benéficos contendo bactérias viáveis/probióticas é pobre. Existem muitas barreiras de comunicação sobre probióticos e o papel da dieta na modulação da flora intestinal. Entretanto, em países com programas educacionais bem planejados entre consumidores e profissionais de saúde o grau de qualidade tem-se elevado. No futuro, as alegações de saúde podem ajudar a informar os consumidores dos potenciais benéficos, mas é crucial que uma normatização apropriada da comunicação, como a desenvolvida na União Européia (*Confederation of the Food Industries of the European Union – CIAA*), sejam adicionadas e que todas as alegações sejam cientificamente substanciais (CIAA 1999).

2.3. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) E SUA RELAÇÃO COM OS PROBIÓTICOS

As bactérias lácticas são bastante difundidas na natureza e capazes de se desenvolverem sob diferentes condições ambientais. São associadas a ambientes ricos em nutrientes, sendo freqüentemente encontradas em alimentos fermentados, como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas. Algumas delas também fazem parte da microbiota natural dos tratos respiratório e intestinal e de cavidades naturais de humanos e animais (Axelsson 1993; Pot *et al.*, 1994). São amplamente utilizadas como fermentos lácticos devido a sua propriedade de conservar os alimentos e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e animais contra infecções intestinais (Dellaglio *et al.*, 1994).

O grupo conhecido como bactérias lácticas, compõe-se de gêneros microbianos que apresentam alguns fenótipos comuns: Gram positivos, e quase sempre catalase negativos. Algumas espécies podem produzir uma pseudo catalase, outras podem apresentar reações positivas em meios contendo hematina ou sangue como um dos seus componentes. Os componentes do grupo são asporogênicos e ácido láctico é acumulado no meio como produto do metabolismo primário. Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo láctico os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e os recém denominados *Lactococcus*. Levando-se em consideração as desagregações, as agregações, as reclassificações e o aparecimento de novos gêneros, atualmente são 15 os constituintes desse grupo (*Aerocococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*) (Holt *et al.*, 1994; Stiles e Holzapfel 1997, citado por Ferreira 2003).

As primeiras definições de bactérias lácticas como um grupo, restringiram-se à capacidade que essas bactérias tinham de coagular ou fermentar o leite. Assim, entre os microrganismos lácticos constavam tanto *Lactobacillus* quanto *Escherichia*, separados posteriormente como Gram positivos e Gram negativos,

por Beijerinck em 1901. A primeira tentativa de organização do grupo foi feita por Orla-Jensen em 1919, que utilizou descritores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para sua classificação, obtendo-se então o primeiro agrupamento composto por sete componentes (*Betabacterium*, *Betacoccus*, *Microbacterium*, *Tetracoccus*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Streptococcus*).

Todos os componentes do grupo láctico são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como vegetais, leite, carne e trato intestinal. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos. Bactérias lácticas isoladas dos intestinos do homem e dos animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, consumidas em números elevados, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos/quimioterapia ou por estresse do hospedeiro. Além disso pode-se citar, a diminuição do colesterol sérico, a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, aumento da absorção de minerais como o cálcio, ferro e magnésio, aumento da resposta do sistema imune do hospedeiro e por meio da atuação de suas enzimas favorecem o metabolismo de algumas substâncias como o da lactose, em indivíduos lactase persistentes (Kim e Gilliland 1983; Marteau *et al.*, 1990a; Igarashi *et al.*, 1994).

Dos microrganismos componentes do grupo de bactérias lácticas, um dos gêneros mais pesquisados tem sido o *Streptococcus* que foi primeiramente estudado em profundidade por Sherman em 1937 que o classificou em quatro grupos (*piogênicos*, *viridans*, *lácticos* e *enterococcus*). A maioria das espécies patogênicas está reunida no primeiro grupo. As bactérias lácticas empregadas como fermentos pertencem ao grupo *lácticos* (atualmente redistribuídos principalmente nos gêneros *Lactococcus/Leuconostoc*) e *viridans* (*Streptococcus thermophilus*). Este representante é a única espécie do gênero empregada na produção de alimentos. Produz ácido láctico na forma L(+), e é uma espécie quase obrigatória na composição de fermentos termófilos e junto com *Lactobacillus bulgaricus*, é responsável pela produção do iogurte, onde um balanço entre as espécies é essencial para a produção do acetaldeído, componente de sabor

característico desta bebida. A espécie ainda tem função de bioajustadora em processos fermentativos, na presença de bactérias probióticas.

2.3.1 GÊNERO *LACTOBACILLUS*

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez por Moro em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno; este pesquisador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. São largamente utilizados na preparação de uma variedade de alimentos como culturas “starter” em queijos e outros laticínios (Bottazzi 1988). O gênero contém o maior número de espécies de bactérias ácido lácticas; é também o mais heterogêneo compreendendo espécies com uma grande variedade de propriedades bioquímicas e fisiológicas. A heterogeneidade se reflete pela extensão do teor de mol% de Guanina mais Citosina das espécies incluídas no gênero que é de 32-53%.

De acordo com o Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, o gênero *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram positivos, regulares e não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos (Kandler e Weiss 1986). Também é freqüente a forma de cocobacilos, sendo comum a formação de cadeias. A motilidade não é usual e, quando presente, dá-se por meio de flagelos peritríquios. Algumas culturas exibem corpo bipolar, granulações internas ou aparência de baga, com reação à coloração de Gram ou azul de metileno. Os grandes corpos bipolares provavelmente contêm polifosfato e aparecem muito densos quando observados por meio de microscópio eletrônico. O tamanho dos bacilos e o grau de curvatura é dependente da idade da cultura. Formas irregulares são observadas em crescimento simbiótico ou sobre alta concentração de glicina, D-aminoácidos ou antibióticos com ação na parede celular.

O metabolismo fermentativo dos lactobacilos produz como produto final do carbono, o lactato, que usualmente não é fermentado. Produtos adicionais são o

acetato, etanol, CO₂, formato ou succinato. Não são produzidos ácidos voláteis com mais de dois átomos de carbono (Sneath *et al.*, 1994).

2.3.1.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DOS *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são microaerófilos (aerotolerantes) e, quando em crescimento na superfície em meios sólidos, geralmente o desenvolvimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e 5% a 10% de CO₂; alguns são anaeróbios em isolamento. Nos meios usuais de crescimento, os lactobacilos raramente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo. Crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2; o crescimento ocorre a 5,0 ou menos. A taxa de crescimento é freqüentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos. Nas diversas espécies, a redução do nitrato não é usual, podendo acontecer porém, quando o pH terminal é estabilizado acima de 6,0 (Kandler e Weiss 1986).

Normalmente, lactobacilos não possuem capacidade de liquefazer a gelatina ou digerir a caseína, mas pequena quantidade de nitrogênio solúvel é produzida por muitas espécies. Indol e H₂S não são produzidos e as provas de catalase e o citocromo são negativos, devido à ausência de porfirina. Todavia, algumas culturas decompõem peróxidos por uma pseudo-catalase e a reação da benzidina é negativa. São encontrados em derivados do leite, grãos, produtos de carne e peixe, água, esgoto, cerveja, vinho, frutas e suco de frutas, conservas de vegetais, silagem, chucrute e massas fermentadas. Fazem parte da microbiota normal da boca, trato intestinal e vagina de alguns animais homotérmicos, incluindo o homem, sendo a patogenicidade rara (Sneath *et al.*, 1986).

O gênero *Lactobacillus* é classicamente composto por espécies homofermentativas obrigatórias (produzem somente ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose), heterofermentativas obrigatórias (produzem

outros compostos desta fermentação) e heterofermentativas facultativas (produzem outros compostos além de ácido fórmico, succínico, láctico e acético)

O gênero *Lactobacillus* conta hoje com 56 espécies reconhecidas, das quais 5 contêm subespécies (*delbrueckii*, *aviarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*) e 18 delas presentes na microbiota intestinal de humanos e considerada de interesse como probióticos (Klaenhammer e Kullen 1999; Tannock 1999a): *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. aviarius*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*.

A dificuldade na classificação é discutida por diversos autores, já que o gênero comporta muitas espécies, sendo algumas, muito distantes geneticamente umas das outras e outras altamente relacionadas, variando somente na extensão da fermentação de alguns carboidratos (Lortal *et al.*, 1997; Torriani *et al.*, 1994; Kandler e Weiss 1986). De acordo com Axelsson (1993), a classificação do gênero é fundamentada em caracteres fenotípicos e fisiológicos, como perfil de fermentação de carboidratos e crescimento a certas temperaturas. Entretanto, rearranjos da taxonomia do gênero são esperados (Gasser 1970; Stackebrandt e Teuber 1987; Torriani *et al.*, 1994; Tailliez *et al.*, 1996).

2.3.2. GÊNERO *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier (1900) em fezes de infantis, sendo denominada de *Bacillus bifidus communis*. Desde então, várias designações genéricas foram propostas para sua denominação: *Bacillus bifidus*, *Bacteroides bifidus*, *Lactobacillus bifidus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacterium bifidum*, *Tissieria bifida*, *Actinomyces bifidus*, *Actinobacterium bifidum*, *Cornebacterium bifidum* e *Cohnistreptothrix bifidus* (Poupard *et al.*, 1973; Rasic e Kurmann 1983).

O gênero foi proposto originalmente por Orla-Jensen em 1924, mas apenas recentemente foi aceito e reconhecido como um gênero independente na oitava

edição do Manual de Bergey. Nesta edição, Scardovi (1986), agrupou 24 diferentes espécies de *Bifidobacterium* separadamente na seção “Bacilos Gram positivos, irregulares, não formadores de esporos”. Esses organismos foram isolados de diferentes fontes como fezes de humanos (crianças e adultos), animais, pássaros, abelhas e esgoto. Biavati *et al.* (1992), classificou o gênero *Bifidobacterium* com 25 espécies isoladas de diferentes fontes.

Através de publicações recentes, verifica-se que o gênero já possui 33 espécies, isoladas de várias fontes, sendo 12 espécies de origem humana (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. gallicum*, *B. dentium*, *B. inopinatum* e *B. denticolens*). Dentre essas espécies, 3 foram isoladas de cárie dentária, não sendo recomendadas para uso como probióticos. (Teshima 2001).

Atualmente, somente cinco espécies de *Bifidobacterium* de origem humana (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis*) têm atraído a atenção da indústria para a produção de produtos lácteos fermentados com fins terapêuticos (Tamine *et al.*, 1995). Observa-se porém, na literatura, a informação de que muitos produtos lácteos probióticos contêm *B. animalis* (de origem animal), o que vem despertando polêmica sobre a efetividade desses produtos (Klein *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 1998).

Meile *et al.* (1997), isolaram e caracterizaram uma nova espécie, *B. lactis*, de iogurte comercial, uma espécie aerotolerante, indicando-o para uso em produtos lácteos. No entanto, estudos recentes utilizando técnicas genéticas têm demonstrado que *B. lactis* e *B. animalis* não apresentam diferenças moleculares quando comparados os genes da lactose desidrogenase e a similaridade da região 16S do rRNA é de 98,6%, o que indica que essas espécies são altamente relacionadas (Roy e Sirois 2000).

Recentemente, Dong *et al.* (2000), isolaram e caracterizaram uma nova espécie, *B. thermoacidophilus*, de um digestor anaeróbio para tratamento de resíduo. Essa nova espécie está relacionada filogeneticamente a *B. thermophilum*, no entanto apresenta características fermentativas distintas, bem como capacidade de crescimento a 49,5°C e pH 4,0.

2.3.2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DAS BIFIDOBACTÉRIAS

Em geral são caracterizados por serem microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbios estritos, embora algumas estirpes sejam capazes de tolerar oxigênio na presença de CO₂ (Sgorbati *et al.*, 1995). No que diz respeito à sua morfologia, podem ter várias formas que incluem bacilos curtos e curvados, bacilos com a forma de cacete e bacilos bifurcados (pleomórficos, que variam do formato uniforme ao ramificado, bifurcados em forma de Y ou V, espatulados ou em forma de clava) (Tannock 1999a). A natureza pleomórfica desses microrganismos não é apenas estirpe dependente, mas depende do meio utilizado para cultivo ou isolamento. Estão inseridos na ordem das *Actinomycetas*, dentro do grupo das bactérias Gram positivas (Sgorbati *et al.*, 1995), e são caracterizadas por um conteúdo elevado de G+C que varia, em termos molares, de 54 a 67%, sendo de 58% nas linhagens humanas, e o restante das espécies tem porcentagens variando entre 55 e 66, possuem também algumas diferenças notáveis ao nível das propriedades fisiológicas e bioquímicas, incluindo os constituintes da parede celular. São organismos heterofermentativos, que produzem ácido acético e láctico na proporção molar de 3:2 à partir de 2 moles de hexose (glicose) e 5 moles de ATP, sem produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfoacetolase, a qual pode por isso ser usada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies. Esta enzima quebra a frutose-6-fosfato em acetil-fosfato e eritrose-4-fosfato (Modler *et al.*, 1990a). É o único gênero bacteriano de origem intestinal que possui essa via fermentativa, sendo conhecida como “via bífida”. Embora bifidobactéria não utilize a via glicose-6-fosfato, algumas espécies possuem baixos níveis da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e aldolase (Biavati *et al.*, 1992). Todas as espécies fermentam a glicose, galactose, frutose e lactose, com exceção de *B. gallicum* que não utiliza lactose (Biavati *et al.*, 1992). A utilização de açúcares

varia entre as espécies, sendo que *B. bifidum* fermentam apenas quatro carboidratos, enquanto *B. adolescentis* podem fermentar 19. Em um estudo que avaliou 290 estirpes de 29 espécies de bifidobactérias de origem animal ou humana Crociani *et al.* (1994), apontaram a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar hidratos de carbono complexos. Os substratos fermentados pela maior parte das espécies foram D-galactosamina, D-glucosamina, amilose e amilopectina. *Bifidobacterium infantis* foi a única espécie capaz de fermentar o ácido D-glucurônico, enquanto que estirpes de *B. longum* fermentaram a arabinogalactana, bem como as gomas arábica, ghatti e tragacanta.

A gama de temperaturas para qual se registra crescimento ótimo oscila entre 37°C e 41°C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45°C e 25-28°C respectivamente. Em relação ao pH, o ótimo verifica-se a valores de pH entre 6,0 e 7,0, com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4,5-5,0 ou a valores de pH alcalinos de 8,0-8,5. Em relação a sua fisiologia, diversos trabalhos já foram revisados (Rasic e Kurmann 1983; Scardovi 1986; Sgorbati *et al.*, 1995).

O perfil de fermentação de carboidratos constitui uma característica fenotípica importante para a identificação de espécies de bifidobactéria. No entanto, a utilização de taxonomia polifásica, onde são combinados métodos fenotípicos e genotípicos para diferenciação de espécies, tem sido recomendada (Klein *et al.*, 1998).

A utilização de produtos de laticínios na veiculação de bactérias bífidas exige técnicas especiais, uma vez que, se permitindo o seu crescimento no leite pode resultar em “off flavor” devido ao acúmulo de ácido acético. Além disso, esse grupo microbiano não tolera ambientes ácidos. Vários produtos alegam a presença deste gênero (ou algumas espécies deste gênero) em seus rótulos, no entanto, em decorrência dos aspectos citados acima, o seu isolamento e identificação nestes produtos devem ser investigados.

2.4. MÉTODOS E MEIOS DE ISOLAMENTO DE LACTOBACILOS E BIFIDOBACTÉRIAS E CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS

Apesar dos vários benefícios à saúde das bactérias probióticas serem reconhecidos mundialmente (Bottazzi *et al.*, 1985; Nakazawa e Hosono 1992; Wood 1992; Roissart e Luquet 1994; Cogan e Accolas 1996; Bottazzi 1997; Mustapha *et al.*, 1997; Kailasapathy e Rybka 1997) e níveis desses probióticos serem sugeridos nos produtos fermentados do leite por vários autores (Arroyo *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1995; Rybka e Kailasapathy 1995), existem poucas recomendações metodológicas para a acurada enumeração desses microrganismos, dessa forma dificultam o controle de qualidade (Rybka e Kailasapathy 1996) e não permitem o estabelecimento de níveis oficiais, ou metodologias oficiais para a enumeração destes microrganismos nos produtos fermentados.

Monitorar o número de células viáveis de microrganismos probióticos nos alimentos em que os mesmos são incorporados é um parâmetro fundamental para assegurar a qualidade do produto que é comercializado com apelo terapêutico, entretanto, muitas vezes essa necessidade tem sido negligenciada em função da falta de padronização de métodos.

Para detectar bifidobacterias e lactobacilos em fezes ou produtos lácteos, diversos métodos podem ser empregados, tais como contagem em placa, técnicas moleculares (baseados em DNA ou rRNA), fluorescentes ou imunológicas, bem como os métodos enzimáticos (Hartemink *et al.*, 1996; Scardovi 1986). Tanto para controle de qualidade de produtos lácteos como para grande maioria dos estudos da microbiota fecal, o método de contagem em placa ainda é o mais utilizado, portanto, o meio de cultura utilizado deve promover o crescimento seletivo da bactéria em estudo, enquanto outros microrganismos devem ser suprimidos. A enumeração diferencial de bactérias probióticas é difícil devido a presença de microrganismos similares nos produtos. Como regra no entanto, para se determinar a viabilidade e sobrevivência das bactérias probióticas, é muito

importante a existência de trabalhos direcionados a métodos para a enumeração seletiva destas bactérias (Tharmaraj e Shah, 2003).

Os meios de cultura para bifidobactérias que têm sido descritos na literatura podem ser classificados em cinco grupos: i) meios não seletivos (MRS, Rogosa, TPY); ii) meios com carboidratos seletivos; iii) meios com antibióticos; iv) meios com propionato e v) meios com substâncias seletivas e/ou pH ácido. No entanto, muitos desses meios não apresentam seletividade para bifidobactéria (Ishibashi e Shimamura 1993), permitindo o crescimento de outras espécies, além disso, os meios contendo antibióticos podem diminuir o crescimento de bifidobactéria, uma vez que a resistência dessas bactérias aos antibióticos pode ser variável (Biavati *et al.*, 1992). Os meios designados para a enumeração específica de bifidobactérias em geral são caracterizados pela presença de substâncias que reduzem o potencial de oxido-redução como a cisteína e cistina, alguns apresentam antibióticos, uma fonte simples de carbono e agentes seletivos para inibir o crescimento de outras bactérias ácido lácticas, e são freqüentemente fortificados com sangue de cavalo ou carneiro (Rasic 1990) no entanto, Teraguchi *et al.*, 1978 usando o agar NPNL considerado seletivo para espécies de bifidobactérias não foi efetivo para o crescimento e a contagem das espécies *B. infantis* 1912, *B. adolescentis* 1920 e *B. thermophilus* 20210. Poucos meios são completamente seletivos para bifidobactérias, o Ágar Beerens e Rogosa SL (incubados por 3 dias) tem sido usado (Mccartney *et al.*, 1996). A comparação da morfologia celular dos isolados de bifidobactérias crescendo em meios padronizados pode auxiliar na identificação (Scardovi 1986) e podem ser suplementados com testes bioquímicos para se diferenciar bifidobactérias de gêneros morfologicamente similares (*Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* e *Eubacterium*) (Tannock 1999a).

Para se isolar lactobacilos que são organismos extremamente fastidiosos e adaptados a complexos substratos orgânicos, que requerem não somente carboidratos como fonte de energia e fonte de carbono, mas também nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas, os meios de cultura devem possuir pH ácido e a carne deve ser um nutriente essencial quando o meio contém

carboidratos fermentáveis, peptona, extrato de levedura e extrato de carne. A suplementação dos meios com suco de tomate, manganês, acetato e ésteres de ácido oléico, especialmente Tween 80 é estimulante ou até essencial para muitas espécies. Estes compostos estão incluídos no meio extensamente utilizado para crescimento e isolamento, formulado por Man, Rogosa e Sharp (1960), o meio MRS, sendo também utilizados nas formulações dos meios APT (Evans e Niven 1951) considerado similar ao MRS, o HHD e LA utilizados neste projeto. De acordo com Rasic (1990), o ágar LA (Modified Bifidus Blood Agar), foi desenvolvido principalmente para a enumeração de *B. bifidum* e *L. acidophilus* em cultura starter e produtos fermentados. O ágar HHD (Homofermentative Heterofermentative Differential Medium) foi desenvolvido para a enumeração diferencial de bactérias ácido láctica hetero e homofermentativas (Lapierre 1990 e McDonald *et al.*, 1987). Embora muitas culturas de lactobacilos usadas em indústria de leite possam ser cultivadas em microaerofilia, ou em condições aeróbicas, os isolados intestinais proliferam-se melhor em condições anaeróbicas. A confirmação dos isolados pertencentes ao gênero podem ser feitos por teste de ausência de atividade da catalase e presença de ácido láctico como maior ácido produzido pela fermentação da glicose. Os ácidos acético, succínico e fórmico podem ser detectados em menores quantidades em algumas espécies (Kandler e Weiss 1986). A determinação dos isolados de lactobacilos nas categorias homo e heterofermentativos (por simples observação, por medida de tubo de Durham ou gás produzido à partir da glicose) são usuais testes fenotípicos.

Vários meios têm sido avaliados por diferentes pesquisadores para a enumeração de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* tanto em culturas puras quanto em culturas mistas nos produtos lácteos (Ongoo e Fleet 1993; Dave e Shah 1996; Grenov citado por Shah (1997a) e Stefano *et al.*, 2000), contudo, é crescente o consenso de que alguns meios que contêm bile e antibióticos podem também restringir o crescimento destas culturas, o que torna a contagem total obtida nestas condições, nem sempre representativa do número verdadeiro de células viáveis presentes no produto (Dave e Shah 1996).

Munoa e Pares (1988), formularam um meio seletivo para bifidobacterias (*Bifidobacterium* Iodoacetate Medium 25 – BIM-25). Este meio tem como base o Reinforced Clostridial Medium (RCM) adicionado de antibióticos (ácido nalidíxico, polimixina B, kanamicina) e outros ingredientes como o ácido iodoacético e o 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). O iodoacetato que inibe a gliceraldeído-3-fosfato dehydrogenase, reduz o crescimento de colônias não bífidas. O TTC possibilita a diferenciação entre *Bifidobacterium* de outras espécies já que as mesmas desenvolvem-se em grandes colônias brancas. De acordo com Munoa e Pares (1988), colônias que são brancas com o diâmetro que claramente excede a 2mm são *Bifidobacterium* sp e colônias pink são formadas por cocos, bifidobacteria e bacilos, sendo que nenhuma bactéria isolada deste meio foi Gram negativa.

Muitos meios seletivos para a enumeração de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. tem sido propostos (Hunger 1986; Hull e Roberts 1984; Laroia e Martin 1991b; Dave e Shah 1996; Lankaputhra e Shah 1996; Wijsman *et al.*, 1989; Shah 1997a, 2000). Similarmente, muitos meios são propostos para a enumeração seletiva de culturas do iogurte (Onggo e Fleet 1993; Samona e Robinson 1994), no entanto poucos trabalhos descrevem a enumeração seletiva de *L. casei* na presença de outras bactérias probióticas e bactérias do iogurte (Champagne *et al.*, 1997; Ravula e Shah 1998). Vinderola e Reinheimer (1999), citam que muitos meios para a enumeração de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., tanto em cultura pura quanto em produtos comerciais não fornecem bons resultados quando se deseja uma enumeração seletiva ou diferencial de *L. acidophilus* e *B. bifidum* na presença de *S. thermophilus* e *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* (Dave e Shah, 1996).

Segundo Lim *et al.* 1995, é importante que os meios propostos para a enumeração (diferencial ou seletiva) dos microrganismos não sejam complexos ou requeiram muito tempo para o preparo, e que ofereçam uma boa recuperação celular dos microrganismos, neste sentido, muitos meios não atendem este requisito de acordo com Lankaputhra e Shah 1996 devido a falta de recuperação de uma ou mais espécies, ou por falta de seletividade (Lim *et al.*, 1995; Pacher e

Kneifel 1996), ou diferenciação entre colônias (Kneifel e Pacher 1993; Ghodduzi e Robinson 1996; Nighswonger *et al.*, 1996). A grande demanda de trabalho, tempo e material existente nos procedimentos convencionais para a seleção e triagem de microrganismos, dificulta a manipulação de grandes volumes de isolados. Sob esta ótica, ao longo das últimas décadas, um novo enfoque vem contínua e crescentemente orientando os procedimentos de rotina em laboratórios de microbiologia no intuito de simplificá-los com técnicas mais rápidas, práticas e automatizadas.

2.5. LEGISLAÇÃO E ROTULAGEM: DISCREPÂNCIAS ENCONTRADAS NOS RÓTULOS DE ALGUNS ALIMENTOS PROBIÓTICOS

Os alimentos probióticos têm recebido atenção especial de cientistas e tecnólogos de alimentos nesta última década, e esta categoria de alimentos foi regulamentada em julho de 1991, no Japão, recebendo o nome de “Foods for Specified Health Use” (FOSHU). A legislação japonesa define FOSHU como alimentos processados que contém ingredientes que auxiliam as funções corporais específicas, além de serem nutritivos, e reconhece 12 classes diferentes como favorecedores da saúde, entre eles as bactérias ácido lácticas (Abreu *et al.*, 2000); ela também estipula que os alimentos lácteos com bactérias ácido lácteas precisam conter pelo menos 10^7 bactéria/mL (Shortt 1999b).

As legislações do Japão e da Comunidade Européia estão mais avançadas no que se referem a alimentos funcionais que a Food and Drug Administration (FDA). O Codex Alimentarius está discutindo um projeto de diretrizes para o uso de declarações de propriedades nutricionais e salutareas (ALINORM 93/22). De uma forma geral as legislações dos países mais desenvolvidos proíbem declarações relacionando alimentos à cura ou prevenção de doenças sem que haja comprovação científica. Até o presente, a FDA não considera as evidências científicas suficientes para garantir a alegação de que qualquer bactéria probiótica tenha efeito benéfico sobre a saúde humana. No Brasil, o Ministério da Saúde reuniu uma equipe multiprofissional, de 24 a 27 de outubro de 1994, para discutir

uma das etapas da legislação de alimentos para fins especiais. A proposta dos técnicos foi de liberar como complementos nutricionais somente as vitaminas e minerais, conforme preconizado na regulamentação do Codex Alimentarius (CX/NFSDU 92/11) e os demais produtos seriam estudados e normatizados oportunamente como “alimentos funcionais” (Cândido e Campos 1995).

Em 1999, a Portaria nº 396 de 30 de abril de 1999 aprova o “Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes”, este regulamento é bastante claro quanto à necessidade de comprovação científica sobre um determinado alimento ou ingrediente funcional. Atualmente, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foi aprovada a Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002, que diz respeito ao “Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde”, sendo que na rotulagem, no caso dos probióticos, deve constar a qualidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto (ANVISA 2002) no entanto alguns pesquisadores como Klein *et al.* (1998), concluem que a maior parte das culturas usadas nos produtos probióticos não possuem a designação correta da espécie. Isto é para o gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como mostrado para os grupos *acidophilus*, *casei* e *longum/animalis*. Muitas das bactérias declaradas como *L. acidophilus* pertenciam a *L. johnsonii* ou a *L. gasseri* (Holzapfel *et al.*, 1996; Pack 1997; Pack *et al.*, 1997). Similares observações puderam ser vistas no grupo *L. casei* onde quase todas as culturas de *L. casei* pertenciam a *L. paracasei*. Adicionalmente, culturas chamadas como *B. longum* eram freqüentemente culturas de *B. animalis* nos produtos de laticínios.

Em produtos probióticos de leite comercializados na Europa o nome da espécie e a designação das culturas, muitas vezes não correspondem com a taxonomia corrente para as bactérias ácido lácticas (Reuter 1997a), como também foram mostrados em outros casos (Hamilton-Miller *et al.*, 1996 e 1999; Holzapfel *et al.*, 1998).

A rotulagem de alguns iogurtes com nome *L. bifidus* são continuamente usados para *B. bifidum* o qual não é uma espécie de *Lactobacillus*. Temmerman *et*

al., (2002), citam produtos com rótulos apresentando espécies de *L. bifidum* (Produtos: Acidophilus Plus Cápsula – Quest Vitamins UK; Psyllium Actif Pó – Biover Bélgica; Kinderyoghurt Mild – J. Bauer KG Alemanha e Natumild – Natuur Hoeve) e *B. casei* (Acidophilus Plus Bifidus Cápsula – Kudos Vitamins and Herbals UK) mencionando a não existência destas espécies, relatando “indistinguível” ou nome inválido, confirmando a falta de regulamentação dos produtos comercializados. Os pesquisadores relatam ainda um produto em cápsula (Bactisubtil – Bélgica) declarando a espécie *Bacillus* IP5832, no entanto após o isolamento e identificação a espécie encontrada foi o *Bacillus cereus*, considerado patogênico.

De acordo com Reid 1999a; Yeung *et al.* 1999; Shortt 1999a; Sanders e Huis In't Veld 1999; Saarela *et al.*, (2000) a composição e rotulagem dos produtos probióticos tem sido alvo de críticas nos últimos anos, além do mais, culturas usadas por fabricantes de iogurtes não são sempre indicadas no rótulo. Produtos, particularmente suplementos, não contêm número ou tipo de bactéria declarada no rótulo ou contêm culturas não mencionadas (Reuter 1997a; Holzapfel *et al.*, 1998; Hamilton-Miller *et al.*, 1999; Temmerman *et al.*, 2002). Nos iogurtes probióticos e leites fermentados os resultados obtidos são mais satisfatórios (Anon 1997), contudo, deve-se salientar a importância do controle de qualidade e segurança na fabricação dos produtos probióticos. Por estas razões, a identificação e taxonomia das bactérias ácido lácticas usadas na fabricação de novos tipos de iogurtes probióticos devem ser estabelecidas (Schillinger 1999).

Um fator muito importante é a escolha de produtos que provêm detalhes da cultura (ou culturas) e assegurem a sua estabilidade ou indiquem a contagem total de viáveis presentes. Nos EUA, a Association Yoghurt National (NYA), é envolvida na certificação, aprovação e segurança dos produtos comercializados (Shortt 1999a), na Europa entretanto, Berner e O'Donnell (1998) e Przyrembel (2001), citam que atualmente não existe um órgão regulamentador e fiscalizador das rotulagens e alegações dadas pelos fabricantes de alimentos funcionais, por isto verifica-se a existência de culturas inexistentes declaradas em rótulos em um número elevados de produtos (Temmerman *et al.*, 2002). No Brasil como a

legislação é recente as empresas passam por um período de regulamentação e adaptação das novas exigências. Um fator adicional que tem sido discutido são as constantes mudanças nos últimos anos da nomenclatura destas bactérias em virtude dos avanços moleculares, o que tem prejudicado ainda mais a regulamentação destes produtos e segurança das informações contidas nos rótulos.

Engesser e Hammes (1994), citam que apesar de muitas características serem idênticas para as bactérias ácido lácticas, exceções são observadas e podem provocar confusões em sua classificação. A taxonomia destas bactérias tem sofrido consideráveis mudanças nos últimos anos, e os conhecimentos gerados para as culturas podem oferecer indicações da sua origem, habitat e fisiologia, os quais são importantes parâmetros para se selecionar novas culturas com aplicações em alimentos fermentados ou para uso como probióticos (Holzapfel *et al.*, 2001).

Yeung *et al.* (2002), sumarizaram alguns estudos que reportaram discrepâncias entre produtos rotulados (Tabela 1).

Tabela 1. Sumário de estudos reportando algumas discrepâncias entre os rótulos e espécies contidas nos produtos probióticos em análises laboratoriais independentes.

Culturas ou produtos incorretamente rotulados ¹ / testados	Espécies não listadas mas detectadas no produto	Método usado	Referência
7/15 Produtos Farmacêuticos	<i>L. paracasei</i> <i>L. leichmanni</i> <i>E. faecium</i> <i>Saccaromyces cerevisiae</i> <i>L. rhamnosus</i>	Estudo de fermentação de carboidratos	Canganella <i>et al.</i> , 1997
Números não delineados; indicando muitos produtos rotulados incorretamente	<i>L. paracasei</i> <i>B. animalis</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. gasseri</i>	Análises de padrão de proteína Estudo da fermentação de carboidratos Eletroforese (PFGE) RAPD	Klein <i>et al.</i> , 1998

Tabela 1. continuação

Culturas ou produtos incorretamente rotulados ¹ / testados	Espécies não listadas mas detectadas no produto	Método usado	Referência
6/192 produtos (suplementos dietários)	<i>L. plantarum</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>Pedioc. pentosaceus</i> <i>P. acidilactici</i> <i>Ent. Faecium</i> <i>L. rhamnosus</i>	API Rapid ID Kit	Hamilton-Miller <i>et al.</i> 1999
3/6 produtos de leite contendo bifidobacteria e rotulado com espécies (10 produtos testados mas rotulado com somente gênero)	<i>B. animalis</i>	Estudo fermentação de carboidratos; hibridização DNA colorimétrica	Yaeshima <i>et al.</i> , 1996
4/6 culturas de <i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. gallinarum</i>	Sondas espécies-específicas	Sander <i>et al.</i> , 1996
5/13 produtos (suplementos dietários)	<i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>E. faecium</i> <i>L. delbrueckii</i>	API Rapid ID Kit	Hamilton-Miller <i>et al.</i> 1996
9/15 ³ culturas de iogurtes "mild" da Europa	<i>L. johnsonii</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. crispatus</i>	Homologia DNA-DNA	Schillinger, 1999

¹ Espécies indicadas detectadas que não são listadas no rótulo;

² 19 suplementos probióticos testados com rótulos indicando a espécie. Outros produtos testados reportados que não incluem neste sumário. Produtos originários de UK e outros países EU.

³ Total de 26 culturas isoladas, mas somente 15 iogurtes foram rotulados com as espécies.

2.6. METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Inicialmente as bactérias ácido lácticas foram classificadas em diferentes gêneros utilizando-se como base as características morfológicas das colônias. Em seguida, foi introduzido para a classificação o modo de fermentação da glicose em condições padronizadas, fatores de crescimento e disponibilidade de oxigênio. Nestas condições estas bactérias se dividiram em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas e na prática, testes de produção de gás à partir da glicose distinguiram os grupos (Axelsson 1993).

A classificação em nível de espécie, utilizando-se as características fenotípicas/bioquímicas são importantes para uma preliminar caracterização bem

como para fornecer um conhecimento sobre as propriedades das culturas. Outras observações como tolerância ao sal e pH, crescimento em determinadas temperaturas e configuração do ácido láctico produzido, também fornecem parâmetros importantes para a classificação da espécie. A fermentação de carboidratos, hidrólise da arginina, formação de acetoína (acetilmetilcarbinol) (Teste de Vogues-Proskauer - VP ou fermentação butilenoglicólica após adição dos reagentes Barrit), tolerância à bile, tipo de hemólise, produção de polissacarídeos extracelulares, requerimentos de fatores de crescimento, características de crescimento em leite, tipagem sorológica e presença de certas enzimas (β -galactosidase e β -glucoronidase), podem também ser utilizados. Tem sido demonstrado que a detecção seletiva de bactéria podem ser concluídas por utilização de suas atividades enzimáticas específicas via reações cromogênicas ou fluorogênicas (Chevalier *et al.*, 1991; Manafi *et al.*, 1991).

De acordo com Pot *et al.* (1993), as identificações por métodos tradicionais fornecem uma preliminar caracterização, mas não para o propósito de identificação acurada, uma vez que os procedimentos podem consumir um longo tempo, serem ambíguos e afetados pelas condições do meio (Schleifer *et al.*, 1995). Deste modo, pode ser impossível que métodos convencionais permitam a diferenciação entre espécies filogeneticamente distintas como descrito por Hayford *et al.* (1999), para *L. reuteri* e *L. fermentum*.

Apesar da identificação de lactobacillus ou bifidobacterias serem baseadas em características morfológicas, em alguns casos, é comum surgirem problemas técnicos que dificultam a interpretação dos resultados obtidos, como por exemplo quando o crescimento bacteriano não é suficiente para degradar o substrato que está sendo testado, dificultando assim a interpretação dos resultados. Além disso, algumas características são instáveis, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado, deste modo às técnicas moleculares têm emergido nos últimos anos e tem facilitado os estudo de identificação dos *Lactobacillus* (Le Jeune e Lonvaud-FuneL 1994) e de *Bifidobacterium* (Tannock 1999).

Um outro fator importante a ser mencionado é que esses métodos, são limitados no caso de culturas isoladas do trato intestinal por exemplo, que

apresenta uma microbiota complexa, podem não permitir a diferenciação de espécies e, certamente, não permitem diferenciar culturas dentro de uma mesma espécie. Da mesma forma, não são adequados para estudos em que se objetiva acompanhar a introdução de probióticos no trato intestinal, porque não diferenciam a cultura administrada na dieta das demais culturas estreitamente relacionadas, além de sofrerem interferências quando não estão em culturas puras, como ocorrem nos iogurtes e leites fermentados.

Recentemente, Stiles e Holzapfel (1997), revisaram a correta taxonomia das bactérias ácido lácticas relacionadas aos alimentos. Uma outra revisão por Charteris *et al.* (1997), focou a detecção rápida e métodos de seleção de lactobacilos e bifidobacterias incluindo-se sondas hibridizadas marcadas para 16S e 23S do rRNA para a identificação das espécies. Este estudo focou as bactérias ácido lácticas presentes em produtos probióticos, suas características fisiológicas e sistemáticas, com especial ênfase nos métodos de tipificação moleculares. No entanto, as culturas de maior importância tem sido investigadas por métodos fenotípicos clássicos (padrão de fermentação) e moleculares ou genotípicos (Klein *et al.*, 1998).

2.6.1. MÉTODOS CULTURAIS DE IDENTIFICAÇÃO PARA *Lactobacillus* E *Bifidobacterium*

As características fenotípicas mais utilizadas na identificação de lactobacilos são: forma, coloração de Gram, arranjo, motilidade, catalase, temperatura máxima e mínima de crescimento e fermentação de carboidratos (33 diferentes tipos) (Kandler e Weiss 1986). Algumas espécies são estreitamente relacionadas e só podem ser distinguidas pelo perfil eletroforético de proteínas (lactato desidrogenase e/ou proteínas totais) ou por métodos moleculares: *L.acidophilus* X *L.gasseri* X *L.crispatus* X *L.amylovorus*, *L.animalis* X *L.murinus*, *L.delbrueckii* X *L.jonsonii*, *L.brevis* X *L.buchneri*, *L.fermentum* X *L.reuteri*. De acordo com Johansson *et al.* (1995), Jacobsen *et al.* (1999), vários métodos tem sido usados para a identificação de lactobacilos, incluindo-se a fermentação de

carboidratos pelo sistema API 50 CHL, no entanto, Schillinger (1999), em estudo de isolamento e identificação de lactobacilos de novos produtos probióticos e iogurtes (*mild*), o padrão de fermentação de açúcares não permitiu a diferenciação entre *L. acidophilus* de espécies fenotipicamente muito similares como o *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. amylovorus* e *L. gallinarum*. Em seu estudo, oito culturas capazes de crescer a 15°C e produzir isômeros do ácido láctico DL ou L-enantiômeros foram identificadas como membros do grupo *L. casei*, que compreende as espécies *L. paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus*. Um outro aspecto ressaltado foi que algumas culturas designadas como *L. acidophilus*, no entanto, foram encontradas sendo das espécies *L. johnsonii* ou *L. crispatus*.

Tannock *et al.* (1999), identificando lactobacilos de diferentes origens, mencionam que os métodos fenotípicos de identificação são difíceis porque requerem, em muitos casos, determinação das propriedades da bactéria além dos testes comuns de fermentação (por exemplo, análise da parede celular e mobilidade eletroforética da lactato desidrogenase) (Kandler e Weiss 1986). Em geral, em torno de 17 testes fenotípicos são requeridos para a identificação de isolados de lactobacilos acuradamente em nível de espécie (Hammes e Vogel 1995). A necessidades de métodos simples e rápidos de identificação são portanto requeridos quando grande número de culturas obtidas durante os estudos de ecologia microbiana do trato intestinal, silage e produtos alimentares são requeridos.

Reque *et al.* (2000), estudando *Lactobacillus fermentum* para uso como probióticos em frangos, utilizou para a seleção das culturas além de aspectos de biossegurança, a bacterioscopia (morfologia por microscopia), o teste de Gram, viabilidade durante a estocagem a 4°C e atividade antimicrobiana (Giraud *et al.*, 1991; Reque 1999). A identificação das culturas foi baseada nas características dos lactobacilos como descrito no Bergey's Manual of Determinate Bacteriology (Buchanan e Gibbons 1974) e fermentação de diferentes fontes de carbono pelo API 50 CHL. Em publicação com seleção de culturas de *Lactobacillus* potencialmente probióticos Chang *et al* (2001), utilizaram para a identificação das culturas as características bioquímicas obtidos através dos Kits API 50CH e 32A

(Bio-Merieux). Jacobsen *et al.* (1999), também utilizaram nos seus estudos o sistema API 50CHL para a seleção de 47 culturas de *Lactobacillus* sp, entretanto algumas bactérias não foram confirmadas pelos métodos moleculares (ITS-PCR). A caracterização fenotípica pelo API 50CHL mostrou ser usado principalmente para selecionar as culturas para uma posterior caracterização, como também relatado por Johansson *et al.* (1993).

De acordo com Kneifel e Pacher (1993), que utilizaram uma metodologia fenotípica (API ZYM teste para atividade da α - e β -D-glucosidase), todas as culturas de *L. acidophilus* testadas apresentaram fraco a elevada atividade, enquanto que para as culturas *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* o teste foi negativo. Foi observado ainda que bifidobactérias de diferentes espécies e outros lactobacilos tiveram diferentes reações colorimétricas para ambas enzimas. Os autores comentam que apesar do perfil obtido pelo API não ser positivo para todas as culturas de *L. acidophilus* testadas, estas bactérias mostraram colônias azuis quando foram re-examinadas no ágar X-GLU. Este efeito foi atribuído a sensibilidade do teste. Em contraste, todas as culturas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* testadas apresentaram colônias brancas neste meio, sendo que nenhuma cultura de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produziu reação colorimétrica nos ágar X-GLU. Na conclusão do trabalho os autores mencionam que quando se pretende caracterizar completamente a microflora total dos produtos fermentados, há a necessidade de se ter meios de cultura seletivos válidos para a contagem de bifidobactéria.

No caso de bifidobactérias até o ano de 1960 a identificação do gênero era feita utilizando-se somente as características fenotípicas entre elas: morfologia da colônia, condições de cultivo, metabólitos formados (L+ isomero de ácido láctico), teste enzimático acompanhado do teste da β -galactosidase utilizando-se o sistema API ZYM (que monitora a atividade enzimática da bactéria) indicando sua atividade para a bifidobactéria mas não para lactobacilos (Roy *et al.*, 1994), estudo de padrões de proteínas por eletroforese (Biavati *et al.*, 1982), lipídeos e constituintes da parede celular os quais são úteis para a distinção dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Outros critérios podem ser utilizados para a

identificação do gênero e são descritos por Rasic e Kurmann 1983. Recentemente as características fenotípicas mais utilizadas na identificação de bifidobactérias são: forma, coloração de Gram, arranjo, motilidade, fermentação de carboidratos (ribose, arabinose, lactose, celobiose, melezitose, rafinose, sorbitol, amido, gluconato) e atividade da enzima frutose-6-fosfato-fosfoacetolase (F6PPK), típica do gênero *Bifidobacterium* (Scardovi, 1986). De acordo com Klein *et al.* (1998) e Sgorbati *et al.* (1995), *Bifidobacterium* sp que atuam como probióticos podem ser distinguidos até certo grau por critérios fenotípicos simples, como fermentação de açúcares e álcool açúcares como, L-arabinose, D-xilose, D-manose, salicina, D-manitol, D-sorbitol e D-melezitose que podem servir como padrões característicos. Algumas espécies são estreitamente relacionadas e só podem ser distinguidas pelo perfil eletroforético de proteínas (frutose-6-fosfato-fosfoacetolase, fosfogluconato desidrogenase (19 tipos), transaldolase (14 tipos) ou proteínas totais) juntamente com observações morfológicas das células ou por métodos moleculares: *B.globosum* X *B.pseudolongum*, *B.adolescentis* X *B.dentium*, *B.thermophilum* X *B.choerinum* X *B.boum*. Análises da composição de peptidoglicana da parede celular são úteis para a identificação de *B. longum*, *B. infantis* e *B. suis* (Bonaparte 1997).

Klein *et al.* (1998), mencionam o teste bioquímico API 50 CH e 89 reações enzimáticas para diferenciação de bifidobactérias. Nos resultados obtidos pelo dendograma gerado, diferentes grupos taxonômicos foram criados. Sete clusters (agrupamentos) puderam ser definidos ao nível de similaridade de 52%. A cultura *B. animalis* (cluster III) e a cultura *B. longum* (cluster VII) mostraram uma relação de 37%. As culturas *B. longum* e *B. infantis* foram agrupadas juntas no mesmo cluster. Os outros grupos taxonômicos foram *B. breve*, *B. boum/B. thermophilum*, *B. pseudolongum/B. globosum*, *B. bifidum* e *B. dentium/B. suis*. Em suas conclusões, os padrões de fermentação para a diferenciação das espécies *longum* e *animalis* examinadas por Reuter (1963) e Mitsuoka (1969) para culturas de origem humana e animal não podem ser aplicadas no geral para culturas de origem do leite (Bonaparte e Reuter 1996). A aplicação de análises numéricas de 138 caracteres no total, de acordo com o método de Gavini *et al.* (1991), permitiu

a classificação de culturas de *B. longum* e *B. animalis* em diferentes clusters e assim a sua diferenciação. No entanto não foi possível diferenciar *B. longum* de *B. infantis*. Esta fina relação entre estas espécies já tem sido mostrada por vários pesquisadores usando-se diferentes métodos (Scardovi *et al.*, 1979; Lauer e Kandler 1983; Bahaka *et al.*, 1993). Reuter (1990), menciona que culturas de origem animal (*B. animalis*) também estão sendo usadas nos produtos fermentados do leite e que as análises fenotípicas como o perfil de fermentação de carboidratos e a atividade enzimática usadas na rotina para a caracterização e identificação de bifidobacteria (Roy e Ward 1992; Yaeshima *et al.*, 1992; Gavini *et al.*, 1991), não distinguem o *B. longum* do *B. animalis* pois os perfis são muito similares. A diferenciação destas espécies parece ser possível através de suas reações bioquímicas, chamada fermentação melezitose. No entanto, Bonaparte e Reuter (1996), mencionam que este padrão de reação não é aplicado em todos os casos e especialmente para nenhuma cultura isolada de produtos de leite, neste sentido, muitos métodos de diferenciação tem sido descritos, incluindo-se eletroforese de proteína de enzimas especiais (Roy *et al.*, 1994), PFGE e PCR (Roy *et al.*, 1996).

Roy *et al.* (1994), mencionam em seu trabalho que análises numéricas da atividade enzimática e padrão de fermentação de carboidratos permitiram uma diferenciação precária das culturas *B. animalis* e *B. longum* isoladas de preparações comerciais. De acordo com estes pesquisadores, este método é falho para a confirmação das espécies, mas diferencia culturas de origem humana de culturas de origem animal. Os pesquisadores ressaltam ainda que os resultados indicam que um grupo de origem animal contem todas as culturas de referência de *B. animalis* e 10 culturas isoladas de leites fermentados ou preparações comerciais. Estes resultados estão em concordância com Biavati *et al.* (1992) que também encontraram *B. animalis* como única espécie presente em preparações de leite fermentado.

Outros pesquisadores têm utilizado para a identificação de bifidobacterias os testes bioquímicos clássicos disponíveis comercialmente como o API 20A e o BBL Crystal, seguido do teste da enzima F6PPK (Mayer *et al.*, 1999). De acordo

com estes pesquisadores, estes testes são suficientes para separar o gênero *Bifidobacterium* de outros microrganismos anareóbicos. Entretanto, os pesquisadores mencionam que para se classificar isolados individualmente em espécies, evidências moleculares são necessárias. Pérez *et al.* (1999), isolando e caracterizando bifidobactérias de origem humana utilizaram para a confirmação das colônias a morfologia bacteriana em microscópio. As colônias Gram (+), em forma de bastonetes, pleomórficas, não esporuladas e estritamente anaeróbias foram selecionadas. De acordo com os pesquisadores todos os microrganismos apresentaram respostas positivas para o teste da F6PPK. Os microrganismos foram ainda submetidos a um padrão de fermentação de 16 carboidratos em caldo TPY com açúcar e púrpura de bromocresol como indicador.

Charteris *et al.* (2001), descreveram o controle de qualidade para os sistemas API 50CH e API ZYM na identificação de culturas de *Lactobacillus* a 37°C. De acordo com eles os sistemas realizam um importante papel na taxonomia polifásica de identificação dos microrganismos.

2.7. ESTUDO TAXONÔMICO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS E ANÁLISE DE AGRUPAMENTO (CLUSTER)

2.7.1. TAXONOMIA NUMÉRICA

A taxonomia numérica foi aplicada para bactérias pela primeira vez nos anos 50 com o objetivo de classificar linhagens individuais em grupos homogêneos (espécies) com base em grande quantidade de tipos de dados diferentes; auxiliando na distribuição de espécies semelhantes em grupos superiores (gênero, família); e usando os dados gerados para melhorar esquemas de identificação.

A classificação pela taxonomia numérica deve ser baseada em muitas características, uma vez que a similaridade pode ser irreal quando se utilizam poucos caracteres (Sneath e Sokal 1973, citado por Goodfellow *et al.* 1985). Nesse ponto, difere da taxonomia clássica que elege poucas características

consideradas importantes (Priest e Austin 1993). Esta taxonomia tornou-se um método de uso comum e de sucesso para classificação e identificação bacteriana. Apesar do valor e utilidade das técnicas numéricas, alguns grupos de bactérias não mereceram a devida atenção. Até poucos anos atrás, existiam poucos estudos para *Lactobacillus*, que são bactérias economicamente importantes e amplamente distribuídas em laticínios, bebidas fermentadas, sendo também encontradas em associação com humanos, plantas e animais (Priest e Barbour 1985).

Através do emprego de taxonomia numérica e agrupamento de linhagens utilizando-se algoritmo, Hauser e Smith (1964), estudaram 59 linhagens de *Lactobacillus* isolados de queijos e 9 linhagens de referência, e obtiveram 5 grupos onde alguns isolados foram agrupados em nível de similaridade de 53% indicando heterogeneidade. Barre 1969, estudou 65 linhagens isoladas de vinho onde a maioria das linhagens foi identificada como *L. buchneri*. Entretanto, Laban *et al.* (1978), examinado 190 linhagens e utilizando API 50 CHL, obtiveram grande número de linhagens que não puderam ser identificadas (Variante 1996).

Devido a diversidade de espécies e variação fenotípica presente no gênero *Lactobacillus*, inconsistências no sistema de classificação levaram a problemas na sistemática desse grupo. Referências a *Lactobacillus* “atípicos” foram indicativos de que ocorreram problemas e divergências entre o que foi descrito como típico na literatura e o que foi encontrado na prática (Hastings e Holzapfel 1987). Em 1994, Goebetti *et al.* (1994), com o objetivo de selecionar culturas iniciadoras, agruparam espécies de *Lactobacillus* construindo grupos, e observaram que linhagens identificadas como espécies diferentes foram colocadas num mesmo grupo em nível de 91% de similaridade. Devido às semelhanças bioquímicas e fisiológicas entre as espécies, os autores sugeriram que estudos genéticos deveriam ser realizados para identificá-las.

2.7.2. TAXONOMIA POLIFÁSICA

A taxonomia e nomenclatura das bactérias ácido lácticas probióticas é até hoje mudada. Desde a descrição dos gêneros *Lactobacillus* por Kandler e Weiss (Kandler e Weiss 1986) e *Bifidobacterium* por Scardovi (Scardovi 1986) muitos grupos taxonômicos tem sido mudados dramaticamente (Schleifer 1987; Klein *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996; Stiles e Holzapfel 1997). A taxonomia não é mais somente baseada exclusivamente em critérios fisiológicos como temperatura de crescimento ou reações de fermentação. É baseada em características fenotípicas e genotípicas que revelam o nível molecular. Atualmente as técnicas fenotípicas e genotípicas tem sido utilizadas para o propósito de identificação e são aplicadas em combinações nos estudos, chamadas de taxonomia polifásica (Vandamme *et al.*, 1996). Esta metodologia é capaz de diferenciar espécies fenotipicamente muito similares mas completamente diferentes genotipicamente. Como conseqüência, a taxonomia (incluindo identificação e classificação) é essencial para a garantia da qualidade. O conhecimento do gênero ou somente do grupo da espécie das culturas probióticas não são suficientes. Além disso, no aspecto de segurança a diferenciação intra-espécies também é aconselhável. É evidente a segurança das culturas usadas em alimentos probióticos, no entanto, critérios para a seleção das culturas são importantes. A diferenciação intra-espécies é necessária para se separar culturas probióticas de culturas patogênicas em potencial. Esta diferenciação não é necessária para o propósito taxonômico puramente, mas fornece dados de segurança biotecnologia. Técnicas moleculares são capazes de resolver estes problemas e provem a base para a garantia da qualidade e serão mais detalhadas nesta revisão.

2.7.3. ASPECTOS TAXONÔMICOS E MUDANÇAS OBSERVADAS NO GÊNERO *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* está entre os gêneros que mais têm sido submetido a desagregação, agregação e redenominação de espécies, o que ocasiona até hoje problemas em sua identificação, classificação e nomenclatura corrente.

2.7.3.1. GRUPOS *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. delbrueckii*

A taxonomia dos grupos *L. acidophilus* e *L. casei* também tem passado por mudanças consideráveis nos últimos anos e causam também confusão (Fujisawa *et al.*, 1992; Pot *et al.*, 1993; Dicks *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1997). Em 1989, a maioria das culturas classificadas como *L. casei* foram separadas desta espécie e receberam um novo nome, *L. paracasei* (Collins *et al.*, 1989). Em 1996, entretanto, ocorreu a rejeição do nome *L. paracasei* e a revisão da espécie *L. casei* foi proposta (Dicks *et al.*, 1996) e o nome *L. zae* foi introduzido para as culturas formalmente pertencentes a *L. casei*.

O desenvolvimento histórico é importante para se entender a recente discussão. Dicks *et al.* (1996), propuseram a revisão do grupo *L. casei* após a primeira Requisição de Opinião em 1991, o qual não teve sucesso (Dellaglio *et al.*, 1991). Somente as espécies *L. rhamnosus* não foram tema de alterações. Mas, de acordo com Dicks *et al.* (1996), *L. paracasei* foi rejeitado e todas as culturas foram incluídas nas espécies *L. casei*. Além disso, a cultura tipo *L. casei* ATCC 393, foi transferida para a espécie *L. zae*. As espécies *L. casei* consistem no momento somente de culturas tipo e poucas culturas adicionais, estas alterações são muito importantes para a nomenclatura das culturas produzidas.

O grupo *L. casei* compreende o recentemente revisado *L. zae*, o *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Historicamente o grupo *L. casei* compreende somente uma espécie, *L. casei*, o qual foi dividido em cinco subespécies: *L. casei* subespécie *casei*, *alactosus*, *pseudopantarum*, *tolerans* e *rhamnosus*. Collins *et al.* (1989), propuseram a reclassificação do grupo e descreveram duas novas espécies: *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. De acordo com estes pesquisadores os membros *L. casei alactosus*, *L. casei pseudopantarum* e *L. casei tolerans*, e a maioria das culturas *L. casei casei* foram separadas à nível de espécie, e

sugeriram-se os nomes *L. paracasei* sp. (nov), *L. paracasei paracasei* e *L. paracasei tolerans*. Apesar de algumas propostas terem sido rejeitadas para o nome da espécie *L. paracasei*, (Dellaglio *et al.*, 1991; Dicks *et al.*, 1996) elas tem sido usadas na nomenclatura corrente.

A nova espécie *L. rhamnosus* consiste somente da cultura que forma a subespécie *rhamnosus*. No entanto a descrição da nova espécie foi baseada somente em um número limitado de experimentos de homologia DNA-DNA e a descrição fenotípica das culturas foi muito pobre. Somente *L. rhamnosus* pode ser facilmente identificado. A parede celular do *L. rhamnosus* contém rhamnose e ela é uma das poucas culturas que são capazes de fermentar rhamnose. *L. casei* e *L. paracasei* não podem facilmente ser diferenciados bioquimicamente. Por esta razão, a taxonômica do *L. paracasei* ainda não é clara.

Klaenhammer *et al.* (2002) citam que quatro subespécies do *L. casei* são reconhecidas: *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* e *L. casei* subsp. *tolerans* (Kandler e Weiss 1986). Entretanto, recentes estudos filogenéticos têm proposto que membros do grupo *L. casei* sejam divididos em três espécies: *L. rhamnosus*, *L. zae* e *L. casei*, com *L. casei* ATCC 334 como cultura neotipo para a espécie mencionada em segundo lugar (Collins *et al.*, 1989; Dellaglio *et al.*, 1991; Dicks *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1997).

Recentemente o *Lactobacillus* cultura GG (ATCC 53103) foi identificado como o *L. rhamnosus*, mas de acordo com Lee e Salminen (1995), vários estudos publicados ainda usam o nome *Lactobacillus* GG.

Em adição ao *L. acidophilus*, outras cinco espécies formam o grupo (*L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. johnsonii*), no entanto somente o *L. acidophilus* (strito sensu) é conhecido a mais tempo. Esta espécie foi descrita por Moro em 1900 como '*Bacillus acidophilus*' e renomeada por Hansen e Moquot em 1970. *L. crispatus* foi descrito em 1953 e as outras quatro espécies, incluindo as espécies de relevância para probióticos, como *L. gasseri* e *L. johnsonii*, foram descritas recentemente nos anos de 1980 e 1992. Neste grupo, as espécies não podem ser facilmente diferenciadas por métodos clássicos, contudo o uso de análise de homologia DNA-DNA, dois maiores grupos puderam

ser definidos e a identificação foi possível. Estes resultados puderam ser confirmados pela impressão digital (fingerprinting) de proteínas realizado por Klein *et al.*, 1998.

O *L. delbrueckii* faz parte do grupo I (homofermentativo obrigatório), o qual pode produzir ácido D-lactico à partir do açúcar hexose via metabólica Embdem-Meyerohof e é incapaz de fermentar pentoses (Axelsson 1998). Esta espécie contém três subespécies (*delbrueckii*, *lactis* e *bulgaricus*), sendo que a subespécie *bulgaricus* é finamente relacionada (<10% seqüência divergente) com o *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. acetotolerans*, *L. gasserii* e *L. amylophilus* (Schleifer e Ludwig 1995; Klaenhammer *et al.*, 2002).

2.7.4. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO (CLUSTERING)

Usualmente as técnicas de *clustering* são aplicadas sobre grande conjuntos de dados não supervisionados com objetivo de identificar padrões que possam descrever algum conhecimento. Desse modo, a tarefa consiste no agrupamento desses dados, o qual pode ser realizado de diversos modos: probabilístico, evolutivo, hierárquico entre outros. Para a realização do *clustering* são necessárias algumas atividades, entre elas: 1) Representar os dados (preparar e transformar os dados através de técnicas para seleção e construção de atributos); 2) Determinar a medida de similaridade (determinação das métricas de similaridade que serão utilizadas para o agrupamento dos dados); 3) Agrupar os dados (submeter o conjunto de exemplos a algum algoritmo para realizar o agrupamento dos dados) e 4) Avaliar os resultados obtidos (o grau de significância dos resultados obtidos pelo algoritmo são analisados). No *cluster* hierárquico (aprendizado não supervisionado), o conjunto de dados é composto por exemplos não classificados. Assim, esse modo de aprendizado consiste em agrupar uma coleção de exemplos não rotulados segundo alguma medida de similaridade. O *clustering* hierárquico constrói hierarquicamente esses agrupamentos em uma estrutura conhecida como dendograma. Esta técnica permite analisar os cluster em diferentes níveis, pois cada nível do dendograma descreve um conjunto

diferente de agrupamentos. Existem duas abordagens que podem ser derivadas do *clustering* hierárquico: aglomerativo e divisivo. Na primeira, inicialmente os dados são distribuídos de modo que cada exemplo represente um cluster e então, esses clusters são, recursivamente, agrupados por meio de alguma medida de similaridade, até que todos os exemplos pertençam a apenas um *cluster*. O *clustering* divisivo, inicia-se com apenas um agrupamento contendo todos os dados e então divide, recursivamente, o *cluster* mais apropriado até que alcance algum critério de parada, que freqüentemente é o número de *clusters* desejados (Berkhin 2002).

No processo de *clustering*, os agrupamentos são determinados segundo uma medida de similaridade que deve ser, cuidadosamente, selecionada de acordo com as características do conjunto de dados, tais como tipo e escala dos atributos (Martins 2003). Para a formação dos agrupamentos devem ser calculadas as medidas de similaridade *intra-cluster* e *inter-cluster*. A primeira determina a semelhança entre exemplos pertencentes a um mesmo cluster, ao passo que as medidas *inter-cluster* determinam a similaridade entre agrupamentos. Um das métricas utilizadas para o cálculo da similaridade *intra-cluster* é a Euclidiana. As métricas de distância *inter-cluster* são usualmente divididas em duas classes, sendo que a principal diferença entre elas está no modo como os clusters são representados (Olson 1995; Dash e Liu 2001; Jain *et al.*, 1999).

2.8. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

A classificação dos microrganismos com base em informações genéticas tem como vantagem a unificação do conceito de espécie, a estabilidade da classificação (que não fica dependente de modificações causadas por poucas mutações) e a obtenção de bons esquemas de identificação (Hagler e Hagler 1991). Além do estudo dos ácidos nucleicos, outros critérios têm demonstrado interesse taxonômico, sendo os mais importantes, a comparação entre proteínas celulares, a composição da parede celular, a composição de lipídios e as

características topográficas da ultra-estrutura celular visualizadas ao microscópio eletrônico (Goodfellow e Minnikin 1985).

Informações sobre parentesco ou similaridade genética possuem aplicações importantes em diferentes áreas da ciência, permitindo identificar linhagens ou populações que devem ser mantidas para preservar a máxima diversidade genética (Thormann e Osborn 1992). Os procedimentos clássicos de caracterização de linhagens bacterianas, que são baseados nas características bioquímicas ou nutricionais, análise de proteínas totais ou a composição das proteínas de membrana, reações imunológicas e do conteúdo plasmático não permitem, em geral, distinguir linhagens aparentemente da mesma espécie (Le Borgeois *et al.*, 1993). A classificação e identificação das bactérias ácido lácticas utilizando-se métodos clássicos tem sido tema de muitas revisões (Hammes e Vogel 1995; Pot *et al.*, 1994; Sgorbati *et al.*, 1995; Apajalahti *et al.*, 2003). Em geral, métodos fenotípicos não são reproduzíveis e a diversidade de culturas (biotipos) destas espécies são reconhecidas (Ballongue 1993; Hammes e Vogel, 1995; Sgorbati *et al.*, 1995). Ácidos nucléicos são universais em biologia celular, e a seqüência de bases de nucleotídeos das moléculas não são influenciadas pelas condições de cultivo. Análises dos ácidos nucléicos deste modo, provem a base dos métodos de identificação e possuem a vantagem da reprodutibilidade. Métodos genéticos são mais promissores para uma rápida e acurada identificação dos lactobacilos e bifidobacteria (Tannock 1999). A diferenciação de lactobacilos termófilos por exemplo pode ser realizada por meio de perfil de enzimas da parede celular em gel de proteína SDS-PAGE (Lortal *et al.*, 1992), porém, diferenças entre subespécies como *lactis* e *bulgaricus* não são possíveis de serem estabelecidas utilizando-se esta técnica eletroforética.

Os métodos que permitem medir a diversidade entre linhagens aparentadas podem ser baseados na comparação da seqüência dos seus genomas ou da seqüência do rRNA ribossomal 16S e a medida da homologia DNA/DNA. Dois métodos são suficientemente rápidos para analisar as numerosas linhagens e podem revelar as diferenças entre linhagens de uma mesma espécie: a eletroforese de grandes fragmentos de DNA em campos pulsados (PFGE) e o

Randomly Amplified Polymorphic DNA-RAPD (Welsh e McClelland 1990; Williams *et al.*, 1990; Tailliez *et al.*, 1996) que serão discutidos nesta revisão.

2.9. FILOGENIA

A filogenia de muitas bactérias são baseadas na comparação de moléculas altamente conservadas que estão presentes em todos os microrganismos. No entanto, genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA), compreendendo regiões conservadas e variadas nesta molécula, são a escolha para os estudos filogenéticos. A comparação das seqüências do rRNA é considerada a mais poderosa e a mais acurada técnica para determinação do grau de relação filogenético dos microrganismos (Woese 1987). Inicialmente, a hibridização DNA-rRNA ou métodos seqüenciando o rRNA foram usados para este propósito (Axelsson 1998; Pot *et al.*, 1997). Técnicas de biologia molecular permitiram o sequenciamento de longas fitas de rRNA, primeiro pelo uso da transcriptase reversa e segundo pela reação da polimerase em cadeia (PCR) seqüenciando as moléculas 16S ou 23S rDNA, as quais resultaram em grandes bancos de base das seqüências. Com base nas informações obtidas nas seqüências 16S/23S rRNA, árvores filogenéticas ou dendogramas foram criados. Dados do sequenciamento do 16S rRNA mostram que identificações utilizando-se somente propriedades fenotípicas como morfologia celular e tipo de fermentação, não correspondem com o conhecimento filogenético. Como conseqüência, certas espécies de bactérias ácido lácticas foram reclassificadas. O desafio para os taxonomistas é a descoberta de determinados caracteres que correlatem com o agrupamento baseado filogeneticamente. Este tem sido extremamente importante para a nomenclatura de espécies sua tipagem e a caracterização de novas culturas probióticas.

Devido a grande maioria das bactérias ácido lácticas serem similares em seus requerimentos nutricionais e de crescimento, sua identificação usando-se métodos microbiológicos clássicos é geralmente impossível. Durante os últimos 20 anos, o uso de sondas moleculares baseadas em seqüências de rDNA para a

identificação das bactérias isoladas de seus meios naturais tem sido reportadas (Tannock 1988). “Primers” (iniciadores) espécie-específicos para PCR que marcam os sítios das regiões espaçadoras 16S-23S rRNA são disponíveis para um limitado número de espécies de *Lactobacillus*. Métodos moleculares para a identificação de espécies de *Bifidobacterium* ainda não são disponíveis. Somente a reassociação DNA-DNA provem reais medidas para a identificação das espécies deste gênero. As bifidobactérias podem ser diferenciadas de bactérias similares morfológicamente pelo uso de primers para PCR gênero-específicos ou por sondas de oligonucleotídeos (Tannock 1999).

Marcantes mudanças têm ocorrido na classificação bacteriana desde a aplicação das tecnologias moleculares. A observação das seqüências do RNA ribossomal 16S pode ser usada como parâmetro evolutivo (Woese 1987). Algumas regiões da molécula do rRNA 16S são conservadas inteiramente em todas as espécies bacterianas enquanto outras regiões não apresentam este padrão o que permite comparar as seqüências de bases dos nucleotídeos entre muitas espécies (Collins *et al.*, 1991; Stackebrandt e Rainey 1995; Vandamme *et al.*, 1996). Do ponto de vista prático, as seqüências do gene 16S rRNA (rDNA) podem ser usados em identificações de muitas espécies bacterianas através de técnicas que utilizam sondas de oligonucleotídeos específicas ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (Langendijk *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Outras regiões do genoma também podem ser alvos para os procedimentos de identificação (Gurtler e Stanisich 1996). Estas informações moleculares permitem identificar seguramente espécies de *Lactobacillus*, mas um maior desenvolvimento de trabalhos restam ser concluídos no caso de bifidobactéria (Tannock 1999).

A comparação das seqüências do gene 16S rDNA dos lactobacilos mostra que as regiões V1, V2 e V3 contêm informações espécie específicas. No entanto, para uma identificação precisa, ampliações pelo PCR e sequenciamento de genes menores (menos de 750 bp) podem ser suficientes, mas o sequenciamento genômico total, são melhores para o estabelecimento das relações filogenéticas. Os genes rRNA 16S, 23S e 5S são arranjados dentro do operon do cromossomo

bacteriano. Informações da seqüência de bases nucleotídicas tem sido determinadas para as regiões entre os genes 16S e 23S chamada de região espaçadora 16S-23S. Muitas bactérias possuem cópias múltiplas do operon rRNA por genoma e a região espaçadora pode variar de tamanho dentro dos diferentes operons. Isto relata o número e tipo dos genes tRNA (tRNA^{glu}, tRNA^{ile}, tRNA^{ala}) localizados em algumas regiões espaçadoras. Primers para PCR que anelam-se a região conservada dos genes 16S e 23S permitem a amplificação da região espaçadora (Gurtler e Stanisich 1996). Muitas vezes, genes ausentes de tRNA e genes com presença de um ou dois tRNA nas regiões espaçadoras são detectados, e estes podem ser purificados em géis de agarose para subsequente sequenciamento. A seqüência de nucleotídeos da região espaçadora de muitas espécies de *Lactobacillus* tem sido determinadas. Estas seqüências mostram que a região espaçadora é hipervariável, e espécie específica. Primers de PCR, baseados nestas regiões, tem sido derivados para a identificação dos lactobacilos de interesse em indústria alimentar (Berthier e Ehrlich 1998; Nakagawa *et al.*, 1994; Tilsala-Timisjarvi e Alatossava 1997). Sondas de oligonucleotídeos baseadas nas análises de domínio hipervariáveis nas moléculas de ácidos nucléicos tem sido derivadas para o propósito de identificação (Schleifer *et al.*, 1995), no entanto, resultados específicos e consistentes são muitas vezes difíceis de serem estabelecidos com estas sondas, como o controle da temperatura e força iônica da solução de lavagem são críticos para obtenção dos resultados.

Testes bioquímicos para identificar membros do gênero *Bifidobacterium* são atualmente substituídos pelo uso de primers para PCR gênero-específicos descritos por Kok *et al.*, 1996 e Kaufman *et al.*, 1997. Estes primers amplificam regiões de 523 bp ou 1.35 kbp, respectivamente do gene 16S rRNA. Sondas específicas para o gênero, Bif164 e Im3, tem sido analisadas para a enumeração da população total de bifidobactéria em fezes e amostras de alimentos, respectivamente (Kok *et al.*, 1996; Langendijk *et al.*, 1995).

Segundo McCartney *et al.* 1996, as regiões V1, V2 e V3 das seqüências do 16 rDNA de 24 espécies de bifidobactérias parecem ser o melhor caminho para a diferenciação das espécies, no entanto, Leblond-Bourget *et al.* (1996) comparando

as seqüências do 16S rDNA de 18 espécies de bifidobacterias, mostrou que a distância de similaridade ente elas era de 92 a 99%. Este alto nível de relação marcaram a impossibilidade de diferenciação entre algumas espécies com base nas análises de seqüência do 16S rDNA (Frothingham *et al.*, 1993).

Seqüências (274 a 552 bp), obtidas por amplificação por PCR das regiões espaçadoras 16S-23S de 18 espécies de bifidobacterias fornecem similares informações filogenéticas quando comparadas com as providas pelo 16S rDNA (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). As seqüências da região espaçadora são mais variáveis, por isso, os pesquisadores sugerem que elas fornecem meios de distinção entre culturas de bifidobacterias, no entanto, estes espaços não contêm informações úteis que possam ser usadas em testes rápidos para a diferenciação de espécies.

Alguns relatos encontrados na literatura têm possibilitado a derivação de sondas de oligonucleotideos espécie-específicas para a identificação de bifidobacterias (Yamamoto *et al.*,1992; Mangin *et al.*, 1995; Ito *et al.*,1992). Contudo, métodos rápidos de identificação de espécies de bifidobaterias permanecem indefinidos. O requerimento de trabalhos na área de reassociações DNA-DNA são os métodos realmente mais apropriados para a identificação das espécies de bifidobaterias (Ballongue 1993; Yaeshima *et al.*, 1996).

Atualmente, a taxonomia bacteriana baseia-se na associação de características fenotípicas e genotípicas, uma vez que as fenotípicas podem apresentar variações (Klein *et al.*, 1998). Resultados apresentados por Zavaglia *et al.* (2000), demonstraram que espécies identificadas como *B. breve* por fermentação de açúcares, quando analisadas por técnicas moleculares de PCR, apresentaram-se como *B. infantis* ou *B. bifidum*. Portanto, para confirmação da identidade desses isolados, é importante que análises moleculares como homologia de DNA ou PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction – Random Amplified Polymorphic DNA) ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sejam realizadas.

As técnicas moleculares são as mais indicadas para discriminação entre espécies e estirpes diferentes dentro de um gênero bacteriano. A técnica de PFGE

(Eletroforese em gel em campo pulsado) tem sido utilizada para diferenciar estirpes, embora não apresente o mesmo poder discriminatório ao nível de espécies. Para o gênero *Bifidobacterium* que apresenta elevado conteúdo de G + C (55 a 64%), as enzimas de restrição ricas em AT como *Asel*, *SpeI* e *XbaI*, que clivam o DNA com menor frequência são mais indicadas (Roy *et al.*, 1996). Segundo Tenover *et al.*, (1995), isolados que apresentam perfis genéticos com 4 a 6 fragmentos diferentes, podem ser considerados como estirpes possivelmente relacionadas. Isolados que apresentam o mesmo número de fragmentos de DNA total, podem ser considerados geneticamente indistinguíveis, sugerindo que esses isolados correspondem a uma mesma estirpe. Isolados que apresentam o mesmo número total de fragmentos, mas de tamanhos diferentes, podem ser considerados estirpes relacionadas. Embora PFGE seja uma técnica genética laboriosa, apresenta alta sensibilidade e pode ser utilizada na taxonomia polifásica de bactérias, onde são combinados métodos fenotípicos e genotípicos para diferenciação de espécies fenotipicamente muito similares mas, genotipicamente diferentes (Klein *et al.*, 1998). Além disso, o perfil genético ou “fingerprint” de bactérias probióticas obtido por PFGE constitui uma ferramenta no estudo da modulação da microbiota por probióticos, uma vez que esta técnica pode diferenciar os organismos endógenos da microbiota de organismos exógenos administrados.

3.0. TIPAGEM MOLECULAR E CARACTERÍSTICAS DOS MÉTODOS DE TIPAGEM

Os métodos de tipagem são baseados em duas grandes categorias: Métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos são aqueles que caracterizam os produtos da expressão gênica para a diferenciação das culturas. Propriedades como o perfil bioquímico, tipos de bacteriófagos, presença de antígenos na superfície celular, e perfil de susceptibilidade antimicrobiana são exemplos de propriedades fenotípicas que podem ser determinados em laboratório. Em decorrência deles envolverem a expressão do gene, estas

propriedades podem variar, baseado em mudanças das condições de crescimento, fase de crescimento e mutações espontâneas. Os métodos genotípicos são aqueles que são baseados na análise da estrutura genética do organismo e incluem o polimorfismo do DNA baseado em padrões de restrição que clivam o cromossomo por enzimas que cortam o DNA em muitos fragmentos (mais de 100) – corte freqüente, ou em 10 a 30 fragmentos cortes infreqüentes, e a presença ou ausência de DNA extracromossomal. Métodos genotípicos são menos sujeitos a variações naturais, apesar disto eles podem ser afetados por inserções ou deleções do DNA dentro do cromossomo, e ganhar ou perder DNA extracromossomal, ou mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios endonucleases de restrição (Tenover *et al.*, 1997).

Muitas técnicas de tipagem molecular podem ser aplicadas para as bactérias ácido lácticas como instrumento para a identificação de espécies ou diferenciação das culturas. As maiores vantagens dos métodos de tipagem molecular são em decorrência de seu poder discriminatório (Klein *et al.*, 1998) e sua aplicabilidade universal. Culturas finamente relacionadas com aspectos fenotípicos similares podem ser atualmente discriminadas por estas técnicas. Métodos de tipagem moleculares aplicadas às bactérias ácido lácticas probióticas incluem o perfil plasmidial, análises de restrição enzimática (REA), eletroforese em gel em campo pulsante (PFGE), polimorfismo amplificado ao acaso (RAPD) e a ribotipagem.

A tipagem molecular é uma caracterização mais detalhada do microrganismo, que utiliza técnicas de biologia molecular para evidenciar uma possível relação genética entre culturas de uma mesma espécie. Esta área adquiriu muita importância nos últimos anos, pois os resultados obtidos pelas técnicas de tipagem molecular são de grande valia para a identificação dos microrganismos empregados como probióticos.

Inicialmente as técnicas de tipagem se constituíam de métodos que avaliavam as características fenotípicas. Nos últimos anos, com as facilidades da manipulação do DNA, técnicas de tipagem molecular estão sendo utilizadas, as quais permitem produzir perfis genotípicos. Como estes métodos examinam o

DNA bacteriano, eles se tornaram mais reprodutíveis e discriminatórios que métodos baseados na análise de características fenotípicas (Olive e Bean 1999; Pfaller *et al.*, 2001).

Várias técnicas que determinam o padrão genotípico de diversos microrganismos estão sendo utilizadas e todas elas caracterizam-se por produzirem fragmentos de DNA os quais, quando submetidos a algum processo eletroforético, produz um padrão (perfil) migratório característico de uma determinada cultura. Este perfil migratório do DNA bacteriano poderá ser visualizado após o gel da eletroforese ser corado com brometo de etídio, ou quando o gel é submetido à técnicas de hibridização.

O perfil migratório (análise cromossomal) pode ser feito pela restrição (clivagem) do DNA por endonucleases de restrição, que são enzimas que clivam o DNA em seqüências específicas. A ação das endonucleases origina fragmentos de DNA, os quais são separados por eletroforese. A distância migratória destes fragmentos mostra o polimorfismo do DNA (“Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP”), que pode ser específico para cada cultura. O perfil migratório também pode ser produzido pela amplificação de determinados sítios do DNA bacteriano, utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (“Polimerase Chain Reaction” - PCR) com “primers” (iniciadores) não-específicos (aleatórios).

Os RFLPs são expressos por um perfil de bandas em gel de agarose ou em membranas e são comparados de acordo com a sua similaridade. RFLPs idênticos ou muito similares indicam culturas com mesmo conteúdo genético, ou seja, culturas idênticas (Pfaller *et al.*, 1992; Sader *et al.*, 1993; Denton *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 2001).

Outras técnicas podem utilizar sondas genéticas, que são seqüências de DNA, fita simples, que reconhecem e se anelam a uma seqüência homóloga complementar de DNA-alvo. As sondas podem ser específicas ou aleatórias e variam em tamanho podendo ter menos de 20 pares de bases ou mesmo representar grandes porções do DNA, com até 1000 pares de bases. A sonda ressalta o fragmento de DNA gerado pelas enzimas de restrição, o qual foi

transferido e imobilizado numa membrana de nylon ou nitrocelulose (método de “Southern Blotting”). Para o propósito de tipagem, as sondas são muito úteis na interpretação do complexo RFLP, gerado por enzimas de restrição de clivagem freqüente (Southern 1975).

3.1. PRINCIPAIS MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E GERAÇÃO DE “FINGERPRINTS” UTILIZADOS PARA BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Esses métodos foram recentemente sumariados por O’Sullivan (1999) e Klaenhammer e Kullen (1999), que apresentam uma excelente revisão do estado da arte e estabelecem as melhores alternativas para a classificação e para a geração de “fingerprints”.

Para a confirmação da identidade e classificação são recomendados métodos capazes de estabelecer relações filogenéticas, particularmente a hibridização DNA-DNA, o sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S e o sequenciamento da região espaçadora ITS (internal transcribed spacer) entre os genes do operon que codifica o rRNA. Essas técnicas são utilizadas hoje por vários laboratórios, porém, exigem uma infra-estrutura não disponível e mesmo desnecessária em laboratórios que não trabalham diretamente com a manutenção de coleções de culturas microbianas. Nesse caso há várias opções de técnicas de geração de “fingerprints”, com diferentes graus de sofisticação e capacidade discriminatória.

Muitas técnicas de tipagem podem ser aplicadas para as bactérias ácido lácticas como instrumento para a identificação de espécie ou diferenciação de culturas. As maiores vantagens dos métodos de tipagem são em decorrência de seu poder discriminatório (Klein *et al.*, 1998) e sua aplicabilidade universal. Culturas finamente relacionadas com aspectos fenotípicos similares podem ser atualmente discriminadas por estas técnicas. Métodos de tipagem moleculares aplicadas as bactérias lácticas probióticas incluem: Análises de Restrição Enzimática (REA), Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP),

Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), Polimerase Chain Reaction (PCR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), e Ribotipagem.

3.1.1. ANÁLISE DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA (REA)

Esta técnica envolve a digestão do DNA cromossomal com endonucleases de restrição. Os fragmentos obtidos são usualmente separados em gel de agarose com eletroforese convencional. Isto resulta em padrões de bandas complexas com tamanho dos fragmentos entre 1000 a 20.000 pb. A complexidade dos padrões de bandas formadas dificulta a visualização e necessita do uso de computadores que analisam dados multivariados (Charteris *et al.*, 1997). A seleção apropriada de enzimas de restrição ou *set* de enzimas são importantes para a obtenção de padrões reveladores. O REA foi aplicado com sucesso para diferenciação entre culturas de *L. acidophilus* (Roussel *et al.*, 1993), *L. casei* e *L. rhamnosus* (Ahrné e Molin 1997), e *L. reuteri* (Ahrné e Molin 1997; Stahl e Molin 1994).

3.1.2. RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM ANALYSIS (RFLP)

A análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição é uma técnica através da qual os organismos podem ser diferenciados pelo perfil de fragmentos obtidos por ação de endonucleases de restrição. A técnica diferencia as espécies ou culturas dentro de uma espécie comparando variações na seqüência do DNA, que resultam em variação nos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição e variação no tamanho e número de fragmentos obtidos por ação dessas enzimas. A análise segue basicamente as seguintes etapas (Towner e Cockayne 1993, O'Sullivan 1999): isolamento do DNA cromossômico, digestão com enzima(s) de restrição, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), coloração com brometo de etídio e fotografia do perfil RFLP.

As endonucleases de restrição cortam o DNA em sítios com seqüências específicas de reconhecimento, cuja posição no genoma é característica de cada

espécie ou cultura dentro de uma mesma espécie. Assim, o número e tamanho dos fragmentos obtidos pela ação de uma determinada enzima de restrição serve como uma “impressão digital” do DNA do microrganismo. Para visualizar essa impressão digital os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose, que separa os fragmentos com base no tamanho, sob a influência de um campo elétrico unidirecional. O princípio da separação é que fragmentos de tamanhos diferentes movem-se com velocidade diferente, de forma que, após o tempo de corrida, vão ocupar diferentes posições no gel. Podem então ser corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (310nm) e fotografados (Towner e Cockayne 1993). A eletroforese convencional separa bem fragmentos com tamanho de até 50Kb, porém, os fragmentos obtidos do genoma completo das bactérias por ação de enzimas de restrição geralmente são maiores, exigindo uma técnica especial de eletroforese, a eletroforese de campo pulsado (PFGE), capaz de separar fragmentos de DNA na faixa de 50Kb a 12Mb. A eletroforese de campo pulsado diferencia-se da eletroforese convencional apenas na forma como o campo elétrico é aplicado, utilizando sucessivos campos elétricos alternados, que forçam as moléculas de DNA a mudar de direção continuamente. A separação é baseada, provavelmente, no fato de as moléculas maiores mudarem de direção mais lentamente do que as menores, resultando na separação por retardamento. Após a corrida os fragmentos são corados na sua posição final e fotografados (Towner e Cockayne 1993).

Os perfis obtidos por RFLP são absolutamente característicos de cada organismo e representa o genoma completo das células, com a vantagem de detectar alterações específicas (deleções, inserções, rearranjos) no DNA de uma determinada cultura ao longo do tempo. É considerada uma das mais discriminatórias (senão a mais discriminatória) das técnicas moleculares disponíveis até o momento (O’Sullivan 1999), embora apresente algumas desvantagens. A mais importante é o grande número de fragmentos obtido, o que torna o perfil bastante complexo e difícil de interpretar, particularmente enquanto não se dispõe de um banco de dados completo para comparação.

O número e a localização desses sítios são únicos para cada genoma, e portanto, o perfil dos fragmentos obtidos também é único. Esses fragmentos, os quais podem ser 50 ou mais, formam um perfil de restrição específico para um determinado organismo (Logam 1994). Essa técnica é simples e rápida e requer pouca quantidade de DNA, podendo ser aplicada no estudo taxonômico de *Lactobacillus* (Manachini *et al.*, 1983; Ståhl *et al.*, 1990; 1994).

A técnica possui a vantagem de ser tecnicamente mais fácil que outras técnicas moleculares, e tem boa capacidade de resolução em nível de gênero e espécies, se comparada com homologia DNA-DNA. O problema da técnica de restrição de DNA consiste no fato que os dados não são expressos por números, como é a técnica de homologia DNA-DNA. Entretanto, esse problema pode ser resolvido com o uso de análise matemática para os perfis obtidos (Ståhl *et al.*, 1990).

3.1.3. ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSANTE (PFGE)

A modificação da análise de restrição do DNA genômico tornou-se conhecida como PFGL. Neste tipo de eletroforese envolve-se periodicamente mudança de orientação do campo elétrico, por isto permite a separação de fragmentos de moléculas de alto peso. PFGE permite o uso de endonucleases de restrição “com cortes raros” os quais geram um pequeno número de fragmentos, resultando em padrões de bandas que são facilmente interpretadas. Este tipo de impressão digital do DNA tipicamente consiste de 5 a 20 grandes e bem definidos fragmentos com tamanhos de 10 a 800 kb. É um método altamente discriminatório e reproduzível e tem sido usado na diferenciação de importantes culturas de bactérias probióticas, como bifidobactéria (Roy *et al.*, 1996), *L. casei* (Ferrero *et al.*, 1996) e *L. acidophilus* (Roussel *et al.*, 1993).

As enzimas (endonucleases) de restrição podem reconhecer seqüências de nucleotídeos curtas ou longas no cromossoma bacteriano. Aquelas que reconhecem seqüências longas produzem um número menor de bandas (fragmentos do DNA), reduzindo assim a complexidade na análise dos perfis ou

padrões cromossômicos. Além disso, a frequência de clivagem de uma enzima de restrição vai depender da composição das bases nucleotídicas do DNA bacteriano, ou seja, enzimas que reconhecem sítios com alto conteúdo de guanina e citosina (G + C) clivam de forma pouco freqüente cromossomas ricos em adenina e timina (A+T). Assim, algumas enzimas vão ter ação de clivagem infreqüente (rara) sobre determinado cromossoma bacteriano (Birren e Lai 1993). No entanto, as enzimas de ação rara geram fragmentos de DNA com alto peso molecular (≥ 50 kb), que não podem ser separados num sistema convencional de eletroforese. Para separar estes fragmentos maiores, um sistema de eletroforese com campos elétricos alternados e um pulso fixo devem ser aplicados (Pfaller *et al.*, 1992; Birren e Lai 1993). Embora os princípios gerais de extração e preparo de DNA sejam muito semelhantes para a eletroforese em campo elétrico pulsado, existem várias formas de alternar a corrente nos sistemas eletroforéticos. Assim, o modo, o percurso e a direção do campo elétrico que se alterna é diferente conforme os diferentes sistemas.

Para a realização do PFGE, a bactéria pode ser cultivada em meios sólidos ou líquidos. As colônias bacterianas são misturadas com agarose com ponto de fusão baixo e esta mistura é distribuída em pequenos moldes. Como resultado, obtemos pequenos blocos de agarose (“plugs”), que contém toda célula bacteriana. Desta forma o DNA bacteriano fica protegido de quebras e degradação. Na etapa seguinte, estes blocos de agarose são submetidos à lise celular com enzimas que vão romper a parede e membrana celular, lavagens com detergentes que eliminarão os resíduos das células e por fim, a digestão com enzimas de restrição. Os blocos de agarose com as bactérias digeridas são colocados em géis de agarose e submetidos à eletroforese em aparelhos onde a direção da corrente elétrica varia em intervalos pré-determinados. No final da eletroforese o gel é corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Birren e Lai 1993).

Pfaller *et al.* (1992) estabeleceram os primeiros critérios para analisar os resultados do PFGE. De acordo com estes critérios dois isolados seriam definidos como uma mesma cultura (mesmo tipo) quando apresentavam perfil migratório

idêntico (mesmo número de bandas, todas localizadas nas mesmas posições, ou seja, 100% de similaridade). Isolados com perfis migratórios entre 90% e 100% de similaridade (1 a 3 bandas de diferença) seriam considerados similares (subtipos). Finalmente, isolados com menos de 90% de similaridade (4 ou mais bandas de diferença no perfil migratório) seriam considerados diferentes. Tenover *et al.* (1995), também determinaram critérios de interpretação para os padrões de PFGE:

- Isolados idênticos (mesmo clone): seriam aqueles derivados de uma mesma cultura ou pertencentes a um mesmo clone, os quais apresentam perfil de macrorestrição idêntico, com o mesmo número de bandas, localizadas na mesma posição;
- Isolados semelhantes (variantes de um mesmo clone): seriam as amostras que apresentam um ou dois eventos genéticos diferentes, representados por diferenças em até seis bandas;
- Isolados não-relacionados (clones diferentes): amostras que apresentam sete ou mais bandas discordantes, representando três ou mais eventos genéticos diferentes.

O PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular mais conhecida e utilizada universalmente, principalmente pelo alto poder discriminatório e pela aplicabilidade desta técnica à maioria das espécies bacterianas. No entanto, alguns autores relataram que a tipabilidade do PFGE pode não atingir 100% (Sader *et al.*, 1993; Romling *et al.*, 1994; Grundmann *et al.*, 1995; Romling e Tummler 2000).

3.1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Entre os métodos de biologia molecular, o PCR é o mais antigo na teoria e o mais versátil na prática. Este método foi proposto no início da década de 1970 como uma estratégia de reduzir o trabalho envolvido no processo da síntese química dos genes (Kleppe *et al.*, 1971). Estas idéias, no entanto, não foram práticas naquele momento, onde os genes ainda não tinham sido seqüenciados, a

enzima DNA polimerase termoestável ainda não tinha sido descrita, e a síntese de oligonucleotídeos (mais tarde conhecidos como “primers”) estava mais para o campo da arte do que da ciência. A técnica foi colocada em prática 15 anos mais tarde e naquele momento foi denominada como reação em cadeia da polimerase – PCR (Mullis *et al.*, 1986).

A PCR é a amplificação de uma seqüência específica de DNA, que visa a produção de milhões de cópias desta seqüência. Uma fita simples do DNA é utilizada como molde para síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA polimerase, que é capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, complementares a fita molde. A DNA polimerase requer, entretanto, um ponto inicial ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subseqüentes sejam adicionados. Este ponto inicial da síntese é fornecido por uma seqüência pequena de oligonucleotídeos, a qual é denominada de “primer” (iniciador). Ambas as fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde que se forneça primers específicos para cada uma delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos primers, que se anelam especificamente as suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento do DNA que se deseja amplificar (Farah 1997).

A PCR é considerada uma metodologia simples, rápida e flexível e desde a sua descoberta, um grande número de variáveis da técnica tem sido descritas, tornando cada vez mais ampla a aplicabilidade da mesma. Versalovic *et al.* (1991), descreveram um método que utiliza a técnica PCR para tipagem molecular, baseando-se na amplificação de seqüências repetitivas (ou elementos repetitivos) do DNA bacteriano. Este método, conhecido como Rep-PCR possui como alvo dois grandes grupos de seqüências do DNA bacteriano: REP (“repetitive extragenic palindromic”) e ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”). As seqüências REP são descritas em numerosas bactérias e por serem seqüências conservadas, permitem que esta técnica seja utilizada com diferentes finalidades. A seqüência ERIC vem sendo muito utilizada para tipagem molecular e não apenas de enterobactérias (Gillings e Holley 1997). Esta última é uma seqüência com 126 pares de bases e caracteriza-se por ser altamente conservada

e localizada nas regiões extragênicas do DNA bacteriano (Versalovic *et al.*, 1991; Olive e Bean 1999).

Para realização do Rep-PCR, o DNA bacteriano pode ser extraído a partir de colônias de bactérias e a amplificação pode ser realizada utilizando um, dois ou vários primers. A interpretação dos perfis moleculares obtidos nestes métodos é mais complexa utilizando a seqüência REP do que utilizando a seqüência ERIC. No entanto, ambas possuem um bom poder discriminatório para a maioria das espécies bacterianas. A técnica é de fácil realização e pode ser feita em um grupo pequeno ou grande de amostras bacterianas. Porém, os critérios para interpretação dos resultados ainda não estão bem estabelecidos. Enquanto alguns autores reconhecem como culturas diferentes as que apresentam apenas uma banda de diferença entre os perfis moleculares, outros autores analisam os resultados em “softwares” que desenham dendogramas e calculam o percentual de similaridade entre as amostras tipadas. Neste caso, são aceitos como culturas idênticas, aquelas que apresentam um perfil de similaridade $\geq 90\%$ (Thompson *et al.*, 1998; Viedma *et al.*, 1999; D'Agata *et al.*, 2001; Pellegrino *et al.*, 2002).

Alguns estudos demonstraram boa correlação entre os resultados obtidos por este método com os resultados obtidos pelo PFGE (Grundmann *et al.*, 1995; Liu e Wu 1997; Olive e Bean 1999). Rep-PCR vem sendo adaptado a aparelhos automatizados, onde os primers são marcados com fluorescência e são utilizados para criarem padrões moleculares com as seqüências REP e ERIC. Este método gera um padrão molecular consistente, que poderá ser armazenado num banco de dados com imagens digitalizadas. No entanto, assim como o PFGE, o Rep-PCR precisa ser padronizado para que seja possível comparar os isolados submetidos a tipagem nos diferentes laboratórios (Olive e Bean 1999).

3.1.4.1. MULTIPLEX-PCR

É a técnica de PCR na sua forma mais simples, é utilizada para amplificar regiões (seqüências) específicas de DNA em bilhões de vezes, usando uma polimerase termoestável (usualmente *Taq*, a DNA polimerase de *Thermus*

aquaticus), deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores (“primers”), cujas seqüências são complementares entre si e à seqüência alvo (“template”). A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, geralmente 30 a 40 e, durante cada ciclo, ocorre a seguinte seqüência de reação: aquecimento a aproximadamente 94°C, para desnaturar a fita dupla do DNA, resfriamento a menos de 55°C (condição típica), para que os iniciadores hibridizem com as seqüências que lhes são complementares nas fitas simples obtidas, reaquecimento a 72°C, para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. A região duplicada geralmente é menor do que 5 Kb, embora atualmente seja possível amplificar fragmentos maiores. Como cada fragmento gerado torna-se o alvo do próximo ciclo de PCR, a amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada a 2^n , onde “n” é o número de ciclos de PCR. Assim, num PCR típico de 35 ciclos, podem ser geradas aproximadamente $3,4 \times 10^{10}$ cópias da seqüência alvo.

Na técnica de Multiplex PCR é utilizado mais de um conjunto de iniciadores, diferentes entre si, para permitir a amplificação simultânea de mais de uma seqüência alvo. Quanto mais regiões são amplificadas, mais confiável é a técnica, porém, o estabelecimento das condições ótimas de reação não é uma tarefa simples e é necessário um conhecimento prévio das seqüências a serem amplificadas. Após a amplificação os fragmentos obtidos são separados por eletroforese em gel de agarose, gerando um perfil de fragmentos característico das culturas testadas. Ventura *et al.* (2001), utilizaram esta técnica para a identificação das espécies e cultura de *B. lactis* e bifidobacterias.

3.1.4.2. RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) OU AP-PCR (ARBITRARY PRIMED POLIMERASE CHAIN REACTION)

É um método rápido e simples que se baseia em PCR. Na reação de PCR, pequenos primers e seqüências ao acaso são usados em condições de anelamento com baixa estringência, o qual resulta em amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos aleatórios. A reprodutibilidade dos padrões de RAPD, no

entanto, são ocasionalmente fracos e o método necessita ser transcrito em condições cuidadosamente controladas. Nas situações em que se objetiva obter perfis de fragmentos do genoma de espécies sobre as quais não se conhece (ou se conhece pouco) as seqüências alvo a serem amplificadas, essa técnica de PCR é a mais indicada. Nesse caso é utilizado um único iniciador arbitrário (geralmente com 10-12 bases), para amplificar as seqüências do DNA com maior homologia, e as condições da reação são modificadas, para permitir o pareamento do iniciador com regiões não totalmente complementares. Quando o iniciador hibridiza, total ou parcialmente, duas regiões do DNA separadas por poucos milhares de bases e localizadas em fitas opostas, o intervalo entre essas regiões é amplificado. Quanto maior o número de fragmentos gerados arbitrariamente, mais discriminatório é o perfil obtido, com a vantagem de ser uma técnica rápida e aplicável a qualquer organismo. A maior desvantagem é que pequenas variações nas condições de reação podem resultar em variações no perfil de fragmentos, comprometendo a reprodutibilidade da técnica.

Os perfis de RAPD tem sido usados com sucesso para distinguir culturas de *Bifidobacterium* (Roy *et al.*, 1996) e entre culturas do grupo *L. acidophilus* (Du Plessis e Dicks 1995). A técnica multiplex RADP-PCR usando uma combinação de 2 iniciadores (*primer*) (10 mer) em reação única possibilitaram a diferenciação de culturas de *Lactobacillus* do TGI de ratos (Daud *et al.*, 1997). Sondas de oligonucleotídeos complementares para o gene rRNA alvo podem ser aplicados na determinação *in situ* de bactéria em populações mistas, como exemplo: espécies de lactobacilos potencialmente probióticos (Pot *et al.*, 1993; Hensiek *et al.*, 1992; Betzl *et al.*, 1990) e bifidobacteria (Frothingham *et al.*, 1993). Sondas de hibridização específicas para gênero do 16S rRNA foram também desenvolvidas para detecção *in situ* de bifidobacteria em fezes humana (Langendijk *et al.*, 1995), e a tipagem cromossômica (cromotipagem) permitem diferenciação entre culturas de *L. rhamnosus* ribopito A (Zhong *et al.*, 1998). Outras novas técnicas desenvolvidas para a tipagem molecular, as quais incluem PCR-ribotipagem, amplified DNA restriction analyses (análise de restrição de DNA amplificado), rep-PCR e restriction ou amplified fragment length polimorfismo, oferecem alto poder

discriminatório e sensibilidade para a diferenciação e identificação de microrganismos probióticos (Holzapfel *et al.*, 2001).

Ward e Timmins (1999), diferenciaram *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* pelo RAPR-PCR, mas os resultados de interpretação entre as três bandas formadas foram de difícil distinção. Em decorrência disto, seus resultados não incluíram o *L. zaeae*.

3.1.4.3. TRIPLET RAPD-PCR OU TAP-PCR

Essa técnica objetiva contornar o problema de reprodutibilidade do RAPD-PCR, introduzindo, intencionalmente, pequenas alterações nas condições de reação, para detectar as seqüências do DNA mais susceptíveis de variação. Para tanto, são realizados três ensaios em paralelo, cada um utilizando uma temperatura de hibridização diferente (38, 40 e 42°C). Após a amplificação os fragmentos são separados por eletroforese em gel e os três perfis obtidos são comparados. Bandas que estejam presentes em pelo menos dois dos três perfis são consideradas flexíveis o bastante para resistir a pequenas variações nas condições de reação e podem ser consideradas na análise do perfil de fragmentos. A técnica é discriminatória ao nível de espécie e culturas dentro de uma mesma espécie, mantendo todas as vantagens do RAPD-PCR, porém, ampliando o limite de confiança dos perfis obtidos.

3.1.5. RIBOTIPAGEM

A técnica foi descrita por Grimont e Grimont (1986) e tem como princípio avaliar o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde está localizado o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o RNA ribossomal (rRNA) das bactérias. Estes genes são altamente conservados nas espécies bacterianas e permitem assim, que esta técnica seja aplicada com sucesso em vários estudos para diferenciar culturas bacterianas. Inicialmente, a ribotipagem foi descrita para ser utilizada com finalidades taxonômicas.

É uma técnica alternativa que seleciona apenas a porção do DNA responsável pela codificação do RNA ribossômico (rRNA) (Towner e Cockayne 1993, O'Sullivan 1999). O rRNA representa cerca de 80% de todo o RNA existente nas células, onde existe em aproximadamente 2.000 cópias, com uma vida média de até 100h (4 a 5 ciclos celulares) (Guimarães 1987, Mordarski 1985). No DNA das bactérias, os genes responsáveis pela transcrição dessas moléculas são organizados em uma única unidade de transcrição, que sedimenta em 30S e contém, além da seqüência completa para o rRNA 23S, 16S e 5S, genes para diversos outros tipos de RNA de baixo peso molecular, que representam o RNA transportador (tRNA). A ordem dos genes é: promotor, 16S, tRNA, 23S e 5S (Mordarski 1985, Tannock 1999a) e, separando cada gene, há seqüências de nucleotídeos chamadas de regiões espaçadoras ITS (internal transcribed spacer), que variam bastante entre as espécies e têm valor na caracterização intragenérica (O'Sullivan 1999). A seqüência de nucleotídeos das regiões espaçadoras de diversas espécies de *Lactobacillus* já foi determinada e apresentou-se hipervariável e espécie-específica (Tannock 1999a). No caso das bifidobactérias, entretanto, essa região, embora mais variável entre as espécies do que a seqüência do rRNA 16S, não se mostrou muito útil para a diferenciação.

A ribotipagem segue basicamente a seguinte seqüência de análise (Towner e Cockayne 1993, O'Sullivan 1999): isolamento do DNA cromossômico, digestão com enzima(s) de restrição, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), "Southern Blot Hybridization" e revelação. A técnica de "Southern Blot Hybridization" é a transferência dos fragmentos obtidos pela ação das enzimas de restrição do gel de agarose para um filtro de nylon ou nitrocelulose, onde são fixados na mesma posição, formando uma cópia exata (blot) do arranjo original. Após a fixação a membrana é colocada em contato com uma sonda ("probe") de rRNA marcado, para que haja hibridização da sonda com as seqüências complementares presentes nos fragmentos oriundos do rDNA (a sonda contém a seqüência 16S + 23S do rRNA de uma *E. coli* - sonda universal). A variedade de fragmentos e padrões moleculares gerados por este processo se dá pelo fato desta seqüência (16S + 23S) ser altamente conservada nas espécies bacterianas, por estes genes

aparecerem em diversas cópias no DNA cromossomal e por estes espaços caracterizarem-se de forma heterogênea, diferindo de operon para operon numa mesma espécie e em diferentes espécies bacterianas (Bingen *et al.*, 1994). A visualização dos fragmentos que hibridizaram depende do tipo de marcador usado na sonda, podendo ser utilizados marcadores radiativos como o ^{32}P (revelação por exposição de um filme de raio X) ou não radiativos, como a acetilaminafluorona (AAF), com digoxigenina ou com marcadores enzimáticos (Stull *et al.*, 1988; Gustaferro e Persing 1992) ou o complexo peroxidase-polietilenoimina (revelação por quimioluminescência, exposição de filme de raio X ou filme Polaroid 667) (Towner e Cockayne 1993).

Outra variável que a técnica apresenta é a escolha da enzima de restrição. Embora a enzima *EcoRI* seja a mais utilizada, a sensibilidade máxima do método pode não estar restrita ao uso de apenas uma enzima de restrição. Se mais de uma enzima de restrição for utilizada, aumentará o trabalho laboratorial, mas, no entanto, o poder discriminatório do método, também aumentará (Bingen *et al.*, 1994).

A técnica da ribotipagem apresenta grandes vantagens quando comparadas a outros métodos que utilizam sondas genéticas. São elas: (1) os genes que codificam o rRNA são altamente conservados, permitindo que uma única sonda genética seja utilizada para todas espécies bacterianas; (2) pelo fato da maioria das espécies bacterianas possuírem múltiplos operons *rrn*, um número razoável de bandas é obtido com a hibridização e (3) todas as bactérias codificam o rRNA e portanto, todas possuem o operon *rrn*. Os padrões de RFLP gerados pela ribotipagem revelam dois níveis de diversidade genética. Algumas das bandas geradas e observadas não variam e são específicas para cada espécie, enquanto que outras são bem variáveis dentro de uma mesma e em diferentes espécies bacterianas. Estes níveis de diversidade genética permitem que a ribotipagem seja utilizada como ferramenta para estudos taxonômicos e também epidemiológicos (Bingen *et al.*, 1994; Struelens *et al.*, 1998).

A ribotipagem vem sendo utilizada para um grande número de espécies bacterianas. No entanto, os perfis moleculares obtidos por esta técnica (ribotipos

ou ribogrupos) podem apresentar características relativamente estáveis dentro de uma mesma espécie e com isto, bactérias não relacionadas podem demonstrar padrões moleculares iguais ou semelhantes (Pfaller *et al.*, 1996; Hollis *et al.*, 1999). Além desta, a ribotipagem apresenta outras desvantagens, incluindo: (1) a técnica é trabalhosa e demorada, pois vários procedimentos são necessários; (2) a ribotipagem não pode ser utilizada para algumas bactérias, que possuem apenas um ou dois operons *rrn*, como por exemplo os gêneros *Mycobacterium* e *Mycoplasma* e (3) bandas com baixa definição podem dificultar a interpretação dos resultados.

A ribotipagem apresenta algumas vantagens em relação ao RFLP (análise do genoma completo) porque o rRNA dos procariotos, embora seja similar em dimensão, difere consideravelmente na estrutura primária (seqüência de bases) (Mordarski 1985, Tannock 1999a), o que permite diferenciar as culturas com base no perfil de fragmentos obtido; os genes do rRNA aparecem repetidos várias vezes no cromossomo da maioria das bactérias (no cromossomo de *E. coli* aparece repetido 6 vezes) e, ainda assim, representa uma fração muito pequena do genoma (cerca de 0,3 a 0,4% do DNA total) (Mordarski 1985), gerando um perfil de fragmentos muito menores e complexos e mais fácil de ler e interpretar; e os genes do rRNA são extremamente conservados e parecem ter evoluído mais lentamente do que os outros genes do DNA completo, provavelmente em função do seu envolvimento na manutenção da estrutura e função dos ribossomos. Por esse motivo, não é necessário desenvolver sondas específicas para cada tipo de microrganismo a ser testado, uma sonda de rRNA de *E. coli*, por exemplo, disponível comercialmente já marcada com marcadores não radiativos, é capaz de hibridizar com os fragmentos de restrição de uma ampla gama de espécies de bactérias, sendo considerada uma sonda “universal”. O maior cuidado a ser observado, nesse caso, é o de selecionar enzimas de restrição que resultem no perfil de fragmentos o mais discriminatório possível. Rodtong e Tannock (1993), utilizando a ribotipagem para avaliar a estabilidade genética de várias culturas de *Lactobacillus* ao longo do tempo, observaram que é necessário utilizar mais de uma enzima de restrição para caracterizar cada cultura. Recomendaram o uso da

EcoRI e *HindIII* para essa finalidade, uma vez que essas enzimas produzem fragmentos numa faixa de pesos moleculares adequada e apresentam seqüências de reconhecimento bastante diferentes. Assim, se houver uma alteração genética que afete o sítio de reconhecimento de uma das enzimas, o ribotipo gerado por essa enzima detectará a alteração, enquanto o ribotipo gerado pela outra ainda será capaz de confirmar a identidade da cultura.

Em geral, os padrões de “fingerprint” gerados pela ribotipagem são mais estáveis e mais facilmente interpretados, diferentes daqueles obtidos para a técnica REA (Charteris *et al.*, 1997). Outras vantagens obtidas por este método é a alta reprodutibilidade e a possibilidade de se usar sondas universais para todas as espécies devido a similaridade dos genes ribossômicos (Pot *et al.*, 1993; Grimont e Grimont 1986). Esta técnica tem sido usada com sucesso nos estudos de diversidade entre as culturas *L. reuteri* e *L. fermentum* isoladas de íleo de ratos (Ning *et al.*, 1997) e para caracterizar culturas de diferentes espécies de *Lactobacillus* (Roussel *et al.*, 1993; Rodtong e Tannock 1993). No entanto, a ribotipagem mostra alto poder discriminatório a nível de espécie melhor do que a nível de cultura. A escolha de enzimas de restrição apropriadas é importante e diferentes ribopadrões podem ser obtidos pelo uso de diferentes enzimas de restrição. Para a diferenciação de culturas de *L. sake* (Björkroth e Korkeala 1996) encontraram as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e a *Clal* como as melhores enzimas entre outras testadas.

3.1.5.1. RIBOTIPAGEM AUTOMATIZADA

Aproveitando as vantagens e tentando resolver as desvantagens da técnica de ribotipagem, uma empresa americana (Qualicon, Wilmington, DE, USA) desenvolveu um sistema de ribotipagem automatizada, chamado Riboprinter® Microbial Characterization System. Este sistema foi desenvolvido inicialmente para atender as necessidades da indústria de alimentos; porém, nos últimos anos, tem sido também constatado a sua importância na identificação e caracterização de bactérias relacionadas às doenças humanas (Bruce 1996; Pfaller *et al.*, 2001). O

sistema automatizado RiboPrinter juntamente com os seus reagentes pré-fabricados permite realizar todos os passos da ribotipagem em 8 horas simultaneamente para 8 identificações individuais sem intervenção de um operador, sendo necessário somente o isolamento e a purificação da colônia a ser identificada.

O processo da ribotipagem automatizada tem início a partir do isolamento bacteriano em meio de cultivo sólido (ágar – incubado overnight). Utilizando-se um palito de repique, uma amostra da colônia bacteriana é obtida e diluída (suspendida) em tampão de lise num tubo de microcentrifuga e homogeneizado. Bactérias Gram positivas são preparados à partir de duas diluições em 40 μ L de tampão de lise enquanto que as bactérias Gram negativas são preparadas em uma única diluição em 700 μ L de tampão de lise. Esta diluição é transferida para um carregador de amostras, que possui espaço para testar oito amostras diferentes. A suspensão celular é aquecida (80°C – 20 minutos) para reduzir a viabilidade das amostras e inativar as nucleases. Seguindo este tratamento de calor, duas enzimas líticas são adicionadas e posteriormente o carregador de amostras é colocado no aparelho. No sistema, a célula bacteriana é rompida e o DNA digerido com enzimas de restrição (*EcoRI* acrescido de um agente láctico). Após digestão, os fragmentos são separados por eletroforese na posição horizontal e no mesmo momento uma membrana de nylon se move na posição vertical, encontrando estes fragmentos, que ficarão imobilizados na membrana (“Southern blotting” modificado) (Bruce 1996; Pfaller *et al.*, 2001).

Na etapa seguinte, ocorre a desnaturação do DNA e a membrana é então lavada e tratada com tampão, também componente do kit Qualicon para ribotipagem. Ocorre num próximo momento a hibridização com sonda marcada por um substrato, que reagirá com o conjugado, ocorrendo a revelação por quimiluminescência após aquecimento da membrana.

Um computador acoplado ao sistema riboprinter irá captar a imagem do gel com uma câmara fotográfica, analisando os perfis moleculares. Cinco padrões de peso molecular são colocados junto com as oito amostras bacterianas no gel. Assim sendo, todos os isolados testados estão ao lado de um padrão molecular

que permitirá a normalização de todas as amostras do gel. Os perfis moleculares são comparados com todos aqueles previamente testados no sistema e coeficientes de similaridade são calculados, baseando-se na posição e na intensidade das bandas. Coeficiente de similaridade $\geq 0,93$ entre dois perfis moleculares, indica que os microrganismos pertencem ao mesmo clone e são denominados, portanto, com o mesmo ribogrupo. Quando o coeficiente de similaridade for $< 0,93$, indica culturas diferentes e um novo ribogrupo será criado para a amostra em questão (Bruce 1996).

A ribotipagem realizada no aparelho Riboprinter® Characterization System (Qualicon) tem sido muito utilizada na indústria alimentícia e na medicina humana e veterinária. Uma alta tipabilidade e altos poderes discriminatórios estão sendo observados por este sistema na caracterização de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A rapidez do processo (8 horas), a automação (reduz o trabalho laboratorial), a facilidade na interpretação dos resultados e a possível padronização inter e intra-laboratorial dos resultados de tipagem molecular, estão elegendo este sistema como um forte candidato para ocupar a categoria de métodos de tipagem molecular para criação de bancos de dados, muito importantes também em estudos epidemiológicos de longa duração (Struelens *et al.*, 1998; Hollis *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2001).

3.1.5.2. TRABALHOS ENCONTRADOS NA LITERATURA QUE UTILIZARAM A RIBOTIPAGEM AUTOMATIZADA

Rodtong e Tannock (1993), trabalhando com algumas culturas de *L. delbrueckii delbrueckii* e *L. delbrueckii bulgaricus* em um estudo comparativo com 55 culturas de *Lactobacillus* utilizaram diferentes técnicas moleculares para a identificação das espécies e entre elas a ribotipagem, fingerprinting M13 DNA e rep-PCR (Miteva *et al.* 1992, 1998a, b). Girraffa *et al.* (1998), também apresentam para a diferenciação das espécies a análise de restrição pela amplificação do 16S rDNA com Eco RI. De acordo com Miteva *et al.* (2001), as enzimas de restrição (Eco RI, Hae III, Alu I entre outras), diferenciam com sucesso as espécies de *L.*

delbrueckii, *L. helveticus* e *L. acidophilus*, mas não separa culturas ou subespécies. Os pesquisadores comentam ainda que a ribotipagem provê mais informações sobre a distribuição os operons *rrn* ao longo do genoma bacteriano.

Tynkkynen *et al.* (1999), em seu estudo comparativo entre as técnicas de ribotipagem, RAPD e PFGE para as culturas de *L. rhamnosus* e *L. casei* também utilizaram o sistema Riboprinter. Entre os objetivos do trabalho os pesquisadores verificaram e compararam a identificação das culturas pelo teste API 50 CHL e PCR específico para a espécie, compararam as análises PFGE, RAPD e a técnica de ribotipagem para a distinção das culturas finamente relacionadas. Em seus resultados de ribotipagem 15 padrões distintos de fingerprint foram obtidos para as 24 culturas de *L. rhamnosus* e *L. casei* estudadas. A tripla banda localizada entre 4.8 e 6.2 kb parece ser um aspecto típico do padrão fingerprint de *L. rhamnosus*; 16 das 18 culturas de *L. rhamnosus* identificadas pelo PCR deram este tipo de impressão digital.

Sakata *et al.* (2002), em seus trabalhos de unificação de *B. infantis* e *B. longum* estudaram o perfil de fermentação dos carboidratos, a hibridização DNA-DNA, a ribotipagem e o polimorfismo amplificado ao acaso (RAPD-PCR). Os níveis de hibridização DNA-DNA entre as culturas *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis* usadas no estudo foram de 67-81% em condições ótimas (42°C), e 63-85% em condições estritas (52°C). Apesar das culturas mostrarem um perfil variado de fermentação de carboidratos, as três espécies foram divididas em três tipos, chamadas de tipo *infantis*, tipo *longum* e tipo *suis* pelo Riboprinter e RAPD-PCR respectivamente. Com o uso da técnica de ribotipagem, os pesquisadores demonstraram que as 25 culturas estudadas foram divididas em quatro clusters contendo três sub-clusters. Mangin *et al.* (1995) aplicando a ribotipagem para a discriminação de espécies de *Bifidobacterium* encontraram que bandas com tamanhos moleculares similares foram geralmente observadas em culturas finamente relacionadas. Por esta razão, cada cluster que produzia bandas específicas, foram consideradas como grupos distintos com espécies individuais.

3.2. CLASSIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E IMPORTÂNCIA DAS CULTURAS STARTERS

3.2.1. CONCEITO DE PROBIÓTICOS

O termo 'probiótico' de origem grega, significa 'para a vida', e tem recebido diferentes definições ao longo dos últimos anos. Tal termo foi inicialmente proposto por Lilly e Stilwell em 1965 (Lilly e Stilwell 1965) como descritivo de compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano; posteriormente, Parker em 1974, (Parker 1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Esta definição era, no entanto, pouco satisfatória uma vez que a palavra 'substância' poderia incluir suplementos tais como os antibióticos, cuja função é virtualmente oposta. Entretanto, Fuller em 1989, (Fuller 1989) definiu os probióticos como suplemento alimentar microbiano vivo o qual afeta benéficamente o hospedeiro animal pela melhora de seu balanço intestinal. Havenaar *et al.*, 1992, propuseram para o termo probiótico a seguinte definição: uma momo ou cultura mista de microrganismos viáveis o que inclui as bactérias ácido lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produtos fermentados, os quais aplicados aos animais ou humanos, exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após ingestão, devido a melhora das propriedades da microbiota indígena (Gomes e Malcata 1999; Suskovic *et al.*, 2001). Recentemente, Guarner e Schaafsma 1998, definiram como microrganismos vivos os quais ingeridos em certos números, exercem efeitos benéficos ao hospedeiro além da nutrição básica. Outras definições tem sido propostas por Naidu *et al.*, (1999) e Schrezenmeir e de Vrese (2001), mas nenhuma delas tem sido aceitas universalmente (Mercenier *et al.*, 2002).

O conceito "probiótico" não é novo, a origem de culturas de produtos do leite foram relatadas no início da civilização e menções do termo são encontradas na Bíblia e nos livros sagrados dos Hindus (Hosono, 1992). No século 20, Elie Metchnikoff, propôs cientificamente os benefícios das bactérias do iogurte,

postulando, que as bactérias dos produtos fermentados com *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* suprimiam fermentações do tipo putrefativas, mantiam um equilíbrio entre bactérias patogênicas e não patogênicas na flora intestinal e o consumo destes iogurtes tinham um papel na manutenção da saúde e na longevidade de certos grupos étnicos. Esta teoria conhecida como “O Prolongamento da Vida” (The Prolongation of Life. Optimistic Studies), foi atribuída aos Búlgaros que ingeriam continuamente estes iogurtes. Em 1905, Elie Metchnikoff identificou o *L. bulgaricus* e com ele desenvolveu um fermento, que passou a ser largamente adicionado a produtos lácteos nos anos que se seguiram.

Em decorrência de vários benefícios à saúde, muitos microrganismos têm sido estudados para serem utilizados como adjuntos dietários, para melhorarem a qualidade nutricional e terapêutica dos alimentos. No entanto, alguns requerimentos são necessários para se alcançar tal propósito. Na tecnologia industrial por exemplo, durante a fermentação dos produtos, alguns fatores devem ser observados, como o aparecimento de alguns metabólitos, incluindo-se os ácidos acético e láctico, os quais ocasionam redução do pH e podem afetar a estabilidade e as propriedades funcionais das bactérias probióticas. Algumas interferências no entanto, podem ser controladas pois são relativas a fisiologia da cultura, mas em decorrência do longo tempo de duração do processamento e das condições de estocagem dos produtos, estas alterações podem provocar mudanças nas propriedades probióticas das culturas. Desta forma, em adição as propriedades tecnológicas, as propriedades funcionais também devem ser consideradas para as medidas de controle de qualidade dos produtos (Tuomola *et al.*, 2001). Com relação aos microrganismos, vários requerimentos devem ser observados. Os produtos de mercado que mais comumente contém bactérias probióticas são os produtos lácteos fermentados, embora boa parte das espécies probióticas cresça pobremente em leite fermentado. Assim, é usual a prática de incorporar fermentos tradicionais nos produtos, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Dave e Shah 1996). As evidências acumuladas até o momento parecem indicar que essas espécies são raramente isoladas em fezes humanas e não sobrevive bem no trato intestinal (Gilliland 1978,

Goldin *et al.*, 1992, Hoover 1993). No entanto, várias pesquisas têm demonstrado seu efeito benéfico sobre a saúde e bem estar do organismo (Bogdanov *et al.*, 1975, Shahani 1976, Bogdanov 1977, Shackelford 1983, Bodana 1990, Beshkova 1998, Tejada-Simon *et al.*, 1999a, Tejada-Simon 1999 *et al.*, 1999b, Lin 1999, Friedrich 2000, Terahara *et al.*, 2000), havendo ainda controvérsias sobre considerar ou não como probióticos os produtos lácteos fermentados exclusivamente com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*. Estes microrganismos não são habitantes do trato intestinal de humanos e animais mas são normalmente isolados de materiais de plantas verdes e leite, respectivamente. Estas bactérias não são altamente resistentes ao ácido e bile. Somente em torno de 15% sobrevivem a passagem através do estômago e em torno de 1% reage no intestino grosso (Pochart *et al.* 1989) mas não pode colonizá-lo (Rasic 1987). De acordo Gilliland e Speck (1977a), bactérias de origem não intestinal como o *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis* são muito sensíveis a bile: concentrações menores que 0,05% são inibitórias. Por outro lado, bactérias probióticas são resistentes a 0,15-0,3% de oxgall (Goldin e Gorbach 1992). Entretanto, Garvie *et al.* (1984) e Kanbe (1992), em estudos com cobaias alimentadas com iogurtes, relataram alterações na flora intestinal destes animais com o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias, os quais afetam o tempo de trânsito intestinal e oferecem um significativo impacto na absorção de nutrientes. Assim, apesar das desvantagens referentes a sua sobrevivência, as bactérias do iogurte podem exercer efeito benéficos *in vivo* devido as enzimas intracelulares, aos receptores antigênicos na superfície celular ou a produção de metabólitos durante a fermentação. Outros fatores que têm sido citados para as bactérias do iogurte e outras bactérias ácido lácticas é a inibição de bactérias patogênicas *in vitro* pela produção de ácidos orgânicos e substâncias equivalentes a antibióticos, entretanto, estas interações não tem sido claramente demonstradas *in vivo*.

3.2.2. PRE REQUISITOS QUE DEVEM SER OBSERVADOS PARA QUE O MICRORGANISMO POSSA SER PROBIÓTICO

Muitos microrganismos têm sido estudados para serem utilizados como adjuntos, para melhorarem a qualidade nutricional e terapêutica dos alimentos. No entanto, alguns requerimentos são necessários para se alcançar tal propósito.

Nem todas as espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentam as características essenciais requeridas para promover efeitos benéficos sobre a saúde. A classificação de uma cultura como probiótica envolve uma série de pré-requisitos que têm sido determinados ao longo dos últimos 20 anos, relacionados com a origem, taxonomia, competitividade, funcionalidade e os aspectos tecnológicos de produção.

A “International Union of Microbiological Societies” concluem que os lactobacilos e organismos relacionados não apresentam riscos clínicos. Entretanto, novas preparações probióticas que incluem outros microrganismos como bifidobactéria, enterococos, propionibactéria e culturas de *Saccharomyces*, tem sido encontrados, e em decorrência disto, é importante a verificação da segurança de novas culturas probióticas (Lee e Salminen 1995). De acordo com Tannock (1998), a escolha dos microrganismos probióticos devem ser baseadas em critérios ecológicos, e entre eles é citado a habilidade da cultura ser metabolicamente ativa no ecossistema intestinal e ser membro permanente da microflora. Segundo Jones e Thomas (1987), são sete os critérios para um microrganismo ser empregado como probiótico: i) não apresentar patogenicidade, ii) ser Gram-positivo, iii) ser produtor de ácido e ácido resistente, iv) apresentar especificidade ao hospedeiro, v) apresentar excreção de fator anti-*E. coli*, vi) ser resistente à bile e vii) ser viável/estável. O desenvolvimento desses critérios ecológicos requer conhecimento dos atributos dos lactobacilos e bifidobactérias o que possibilita aumentar a sua habilidade e atividade no conteúdo intestinal (Tannock 1998). As culturas probióticas podem ser usadas e ativas somente no ecossistema humano ou animal se cumprir um grande número de critérios. Os critérios para esta seleção e avaliação foram resultados de pesquisas colaborativas de instituições e universidades com a indústria de alimentos. A lista

de propriedades esperadas para as culturas potencialmente probióticas de bactérias ácido lácticas foram compiladas por vários pesquisadores (Klaenhammer e Kullen 1999; Marteau e Rambaud 1993; Havenaar *et al.*, 1992). Mais de 20 critérios tem sido colocados para esta seleção (Kim 1988; Huis In't Veld e Shortt 1996; Holzapfel *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1998) e uma vez que a cultura é selecionada, sua caracterização deve ser realizada (Havenaar *et al.* 1992).

Muitos destes critérios são baseados em extensas pesquisas com seleção microbiana, propagação (viabilidade, capacidade tecnológica) e segurança de uso das bactérias em alimentos (não patogênicas, não tóxicas, geralmente estáveis e habitantes normais das espécies alvo). Contudo, critérios de seleção que debatem a competitividade e performance ainda são controversos pois os mecanismos pelos quais os probióticos exercem suas funções "*in vivo*" ainda não são compreendidos (Klaenhammer e Kullen 1999). A aderência, habilidade de colonização, atividade antagonista a microrganismos entéricos patogênicos e perfil antibiograma são também comumente determinados (Charteris *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 1998).

O interesse no uso de agentes microbianos vivos objetivando a manutenção da saúde e a prevenção da doença ou seu tratamento, explodiu nos últimos anos. Muitos destes microrganismos estão sendo propostos como verdadeiros remédios para um amplo número de condições gastrointestinais e sistêmicas, desde a doença diarréica à alergia e à prevenção do câncer. Recentemente, diversos livros e revisões foram dedicados a esse tópico (Elmer *et al.*, 1996; Naidu 1999 e Saavedra 2000).

De acordo com Ziemer e Gibson (1998), várias funções têm sido inferidas aos diferentes microrganismos probióticos, e várias já foram avaliadas "*in vivo*", na espécie humana.

Quanto aos critérios dietéticos e terapêuticos culturas probióticas destinadas ao consumo humano devem ser originárias do trato intestinal humano (Klaenhammer e Kullen 1999), porque são altamente compatíveis com o ambiente intestinal e tolerada pelo sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que persistem nesse ecossistema ao longo do tempo (Tannock 1999b). Segundo Kim

(1988), as bactérias probióticas por serem habitantes naturais do trato intestinal, não provocam distúrbios no balanço da flora nativa presente.

Quanto ao aspecto taxonômico culturas probióticas devem ser identificadas e classificadas acuradamente, com base em suas características fenotípicas e, principalmente, genotípicas. Na caracterização genética é importante incluir análises filogenéticas em diferentes graus de sofisticação, objetivando não só a correta classificação, mas também a geração de “fingerprints” ou impressão digital da bactéria que permitam a inequívoca recuperação e identificação em alimentos e também quando introduzidas no sistema gastrointestinal em estudos de sobrevivência, colonização e atividade funcional “*in vivo*” (Klaenhammer e Kullen 1999). Contudo, a literatura referente ao controle da microbiota intestinal com microrganismos vem sendo estudada sob a ótica de vários autores, que utilizam termos como antagonismo bacteriano (Freter 1956), interferência bacteriana, efeito, resistência à colonização (Van Der Waaij *et al.*, 1971) e competição exclusiva (Lloyd *et al.*, 1977), os quais, em essência, diferem do termo probiótico por não se importarem tanto com a identificação das linhagens, dando maior relevância aos efeitos benéficos gerados pelas mesmas (Fuller 1989).

Para resistir às condições do trato gastrointestinal culturas probióticas devem apresentar tolerância à bile e atividade de hidrólise de sais biliares, além de resistir a condições ácidas e ricas de proteases no estômago. Adicionalmente, devem ser capazes de competir com a microbiota normal e resistir aos metabólitos produzidos por membros dessa microbiota, incluindo bacteriocinas, ácidos orgânicos e outros agentes antimicrobianos (Klaenhammer e Kullen 1999). Bactérias probióticas variam consideravelmente em seus níveis de tolerância a bile. O mecanismo da tolerância e o nível mínimo aceitos para os candidatos a probiótico permanecem desconhecidos segundo Klaenhammer e Kullen (1999). A maioria das bactérias são destruídas quando passam pelo estômago humano em função da presença do suco gástrico que é um dos nossos melhores mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos. A motilidade intestinal e o efeito inibitório dos sais biliares dificultam a colonização no intestino delgado (Naidu *et al.*, 1999). Os microrganismos ingeridos são expostos durante o trânsito intestinal a

sucessivos fatores de stress que influenciam na sua sobrevivência (Marteau *et al.*, 1993a; Simon e Gorbach 1987). Os papéis do pH gástrico e peristaltismo gastrointestinal na prevenção da colonização bacteriana no intestino delgado são bem estabelecidos (Heatley e Sobola 1993; Simon e Gorbach 1987), entretanto, o papel da bile ainda é tópico de debate (Simon e Gorbach 1987), primeiro por que a concentração de sais biliares no intestino não é estática, mas muda com o tempo e em diferentes partes do intestino delgado, e após a refeição, a concentração deste sal nitidamente aumenta no duodeno (15mmol/L) e progressivamente decresce (5mmol/L). No jejuno, a concentração é de 10mmol/L e, no íleo é menor que 4mmol/L devido a ativa absorção ileal (Northfied e Mccoll 1973). Em segundo devido a formação de micelas com os fosfolipídeos (encontrados na bile total) e portanto, tem alta atividade antibacteriana em relação a soluções artificiais do sal biliar puro (Sung *et al.*, 1993). E finalmente, *in vivo*, o sucessivo stress pelo ácido gástrico e bile pode ser presumido para exercer um alto efeito antimicrobiano do que cada um destes parâmetros sozinhos. A sobrevivência de microrganismos tem sido escassamente quantificada *in vivo*, exceto para algumas espécies de bactérias ácido lácticas (Berrada *et al.* 1991; Marteau *et al.*, 1992; Pettersson *et al.* 1985; Pochart *et al.* 1992; Robins-Browne *et al.* 1981) devido a dificuldade na amostragem do estômago humano (geralmente biopsias da mucosa intestinal, pois as análises de fezes refletem somente parte da flora do intestino grosso e são pobres indicadores da flora do trato gastrointestinal (Savage 1977; Sharpe 1981) e devido a restrição ética, deste modo alternativas devem ser adotadas *in vitro* para se simular tais condições e que estas possam ser utilizadas para a verificação dos critérios de seleção relatados. De acordo com Marteau *et al.* (1997), modelos de validação “*in vitro*” permitem um rápido “screening” das bactérias probióticas. Muitos estudos investigaram a sobrevivência de *L. acidophilus* e/ou *Bifidobacterium* spp. na presença de ácido e sais biliares (Conway *et al.*, 1987; Berrada *et al.*, 1991; Holcomb *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1993; Clark e Martin 1994; Lankaputhra e Shah 1995; Marteau *et al.*, 1997; Chou e Weimer 1999), neste aspecto, a tolerância ao ácido é também importante para os probióticos sobreviverem no alimento (Lee e Salminen 1995). O veículo alimentar dominante

para os probióticos são os iogurtes e leites fermentados, ambos apresentam relativamente baixos valores de pH no meio os quais a bactéria deve sobreviver. Conseqüentemente, a tolerância ao ácido é a primeira propriedade que deve ser analisada para a seleção de culturas probióticas. Simples testes *in vitro* podem ser usados para se determinar esta tolerância para bactérias ácido lácticas e culturas de bifidobactérias propostas como probióticas nas indústrias de alimentos. Desta forma os resultados obtidos nestes testes podem predizer a habilidade da cultura em sobreviver em produtos ácidos. A validação *in vivo* da sobrevivência através do estômago humano é mais difícil de ser obtida. Determinações *in vitro* examinando o efeito inibitório dos ácidos biliares no crescimento de culturas probióticas são também relativamente simples de execução, embora novamente a extrapolação quantitativa da performance *in vivo* seja difícil. Variações intra-espécies da habilidade de crescimento em presença de bile são freqüentemente observadas entre culturas potencialmente probióticas e testes *in vitro* podem ser usados para a seleção das melhores culturas (Tuomola *et al.* 2001).

Estes testes *in vitro* para a seleção de culturas tolerantes ao ácido e bile podem facilmente ser aplicados para a garantia da qualidade da cultura probiótica durante a fabricação, estocagem e “shelf life” do produto. Fatores do meio que afetam a regulação gênica (em curto período de tempo) como fase de crescimento da cultura e stress conduzindo a produção de proteínas de shock, e seleção de variantes através de subcultura (repicagens em longo período de tempo) podem produzir mudanças na performance da cultura (Lee e Salminen 1995; Lee e Wong 1998).

A habilidade do *Lactobacillus acidophilus* em sobreviver e reter sua viabilidade através do trato é uma das principais características desejadas para a atividade probiótica (Kos *et al.* 2000). A resistência ao trânsito gástrico humano tem sido demonstrada *in vivo* para bactérias ácido lácticas probióticas e constitui-se um importante critério de seleção *in vitro* para as bactérias probióticas, contudo métodos satisfatórios *in vitro* que simulam finamente o trânsito gástrico *in vivo*, não tem sido definidos. Neste propósito a água destilada acidificada com HCl, caldo e tampão tem sido usados como substituto do suco gástrico humano fresco

(Suskovic *et al.*, 1997; Conway *et al.*, 1987). Conway *et al.* (1987), demonstraram que a bactéria sobrevive melhor em suco gástrico humano do que em tampão com pH equivalente indicando que os estudos usando tampões provavelmente subestimam a sobrevivência potencial *in vivo*.

Outro requisito que o candidato a probiótico deve apresentar é a funcionalidade. Bactérias probióticas devem ser capazes de exercer um ou mais efeitos benéficos sobre a saúde, como antagonismo contra bactérias patogênicas, produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos), estimulação do sistema imunológico, atividade antimutagênica ou anticarcinogênica (Klaenhammer e Kullen 1999). Diferentes culturas podem exercer diferentes efeitos baseados na capacidade específica e atividade enzimática em uma espécie (Ouwehand *et al.*, 1999; Bernet *et al.* 1993), porém, estas capacidades e atividades não podem ser transferidas para outras culturas ou espécies relacionadas.

Quanto aos aspectos tecnológicos de produção, a adição de bactérias probióticas aos produtos lácteos exige uma série de cuidados. Entre as dificuldades pode-se citar a pouca palatabilidade e o longo tempo de fermentação, lembrando-se ainda que a tecnologia empregada no processamento deve ser a mesma empregada para os produtos não probióticos, para não ocorrer descaracterização do mesmo e ainda assim, garantir a sua funcionalidade (Ferreira 2003). A viabilidade das bactérias probióticas nos iogurtes depende de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre eles, as culturas usadas, as interações entre as espécies presentes, as condições culturais, a composição química do meio de fermentação, a produção de peróxido de hidrogênio devido ao metabolismo bacteriano, a acidificação final do produto, teor de sólidos no leite, disponibilidade dos nutrientes, da concentração de ácidos acético e láctico, temperatura de estocagem e oxigênio dissolvido (especialmente para bifidobactérias) (Kailasapathy e Rybka 1997; Shah 2000).

Alguns fatores podem ser citados para o direcionamento do processamento dos produtos probióticos, entre eles a adequação da cultura levando-se em consideração o público alvo, a funcionalidade esperada relacionada a espécie

(ação no intestino delgado ou grosso), sobrevivência no leite, produção de ácido na taxa esperada (ou carregada na forma concentrada), não alteração do sabor característico do produto, resultar em produto com textura adequada, a cultura deverá ser resistente a acidez do produto e as rápidas mudanças de pH após ingestão, deve resistir a presença de bile e de outras secreções intestinais, o produto deverá ser eficaz no carregamento da cultura, cujos níveis mínimos deverão ser 10^5 - 10^6 UFC/g ou mL do produto para *Lactobacillus* ssp e 10^7 UFC/g ou mL do produto para *Bifidobacterium* ssp (Robinson 1987; Kurmann e Rasic 1991; Dave e Shah 1997; Ferreira 2003). De acordo com Salminen *et al.* (1993), Gilliland (1989) e Sellars (1991), para o desenvolvimento de qualquer efeito benéfico nos humanos um consumo diário de 1×10^6 - 1×10^9 de células são necessários. As bactérias devem ainda apresentar boa taxa de crescimento e manutenção de sua viabilidade em altas populações durante o processo de produção e durante todo o prazo de validade do produto (Robinson 1987; Anonymous 1992). Esta alta contagem é justificável, pois uma redução do número de microrganismos durante a passagem pelo estômago e intestino é citado na literatura. No entanto, estudos têm mostrado baixa viabilidade dos probióticos nas preparações comerciais (Schioppa *et al.*, 1981; Hull *et al.*, 1984; Anon 1997; Anonymous 1992; Iwana *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1995), contudo, pesquisas tem sido realizadas neste contexto para se aumentar a viabilidade destes produtos nos últimos anos (Dave e Shah 1997). A necessidade de monitorar a sobrevivência de *L. acidophilus* e bifidobactéria nos produtos fermentados tem sido negligenciada, com produtos apresentando número baixo de bactérias viáveis (Anonymous, 1992; Shah *et al.*, 1995). A *Australian Food Standards Code* não especifica o número de bactérias probióticas em produtos fermentados, contudo, em outras países esta padronização tem sido desenvolvida e requerida. No Japão, os padrões desenvolvidos pela *Association Beverages Bacteria Acid Lactic and Milks Fermented* requerem um mínimo de 10^7 células viáveis por mL presente nos produtos frescos de leite (Robinson 1987). Por esta razão, esforços para seleção correta de culturas e melhoria na viabilidade são comercialmente importantes, principalmente, para as bactérias bífidas que crescem pouco no leite, produzem

pouco ácido, prolongando o tempo de fermentação. Alternativas importantes como o uso de culturas lácticas bioajustadoras podem ser utilizadas para estes produtos. Dentre as culturas utilizadas para este fim pode-se citar os *Lactococcus* spp. e os *Streptococcus/Lactobacillus* (Ferreira 2003).

Lankaputhra e Shah 1994 e 1995 e Lankaputhra *et al.*, 1996b, relatam que os principais fatores que afetam a viabilidade das culturas probióticas durante a fabricação e estocagem do iogurte são a acidificação, o pH e o peróxido de hidrogênio. Outros fatores como a temperatura de estocagem, conteúdo de oxigênio, concentração de ácidos láctico e acético, entre outros, também tem sido citados e várias pesquisas têm reportado os efeitos destes fatores (Gilliland e Speck 1977; Hull *et al.*, 1984; Martin e Chou 1992; Klaver *et al.*, 1993; Kneifel *et al.*, 1993; Medina e Jordon 1994; Patidar *et al.*, 1994; Prajapati e Dave 1994; Samona e Robinson 1994; Rybka e Kailasapathy 1995), contudo, estes parâmetros não tem sido estudados simultaneamente (Dave e Shah 1997) o que retardam e prejudicam ainda mais o avanço tecnológico dos iogurtes com estas culturas.

3.2.3. ALEGAÇÃO FUNCIONAL

Os aspectos nutricionais e de saúde dos alimentos funcionais que incorporam bactérias probióticas tem recebido considerada atenção e eventualmente conduzem as numerosas alegações destacadas na literatura (Gomes e Malcata 1999), estas por sua vez foram sumarizadas por Gurr (1987), e revisadas em detalhes por Gilliland 1990, Marteau e Rambaud (1993) e Yaeshima (1996), contudo muitos destes estudos para alguns aspectos são variados e inconsistentes, deste modo as evidências não são claras, e as pesquisas devem então buscar dados mais reais utilizando-se metodologias apropriadas e validações estatísticas, com especial ênfase na integridade intestinal e modulação imunológica. Um elevado número de pesquisas de colonização e dose-resposta tem sido publicados (Saxelin *et al.*, 1995). Apesar das inúmeras evidências dos efeitos benéficos das bactérias probióticas, segundo O'Sullivan *et al.*, (1992),

essas pesquisas precisam de mais suporte científico, uma vez que erros podem ocorrer nos delineamentos experimentais, nas análises estatísticas, na escolha inadequada das culturas, além de falhas no controle de qualidade das culturas e produtos. Segundo Sanders e Huis In't Veld (1999), os estudos que documentam os efeitos dos probióticos em humanos ainda são limitados, no entanto o uso de probióticos comerciais continuam pois essencialmente eles não causam nenhum risco à saúde e muitos benefícios são incontestáveis, como o controle da diarreias e a melhoria na intolerância à lactose.

Para exercerem efeitos probióticos as bactérias devem ser capazes de aderir à superfície da mucosa intestinal. Os mecanismos empregados na adesão em muitos casos não estão bem definidos, mas sabe-se que estão ligados à produção de proteínas, glicoproteínas e carboidratos especificamente para esse fim ou devido a componentes da própria membrana celular que ajudariam na aderência. Entretanto, bactérias em trânsito pelo intestino também podem exercer efeitos positivos sem a aderência propriamente dita, é o caso das bactérias do iogurte que hidrolisam a lactose presente no produto lácteo e não aderem ao intestino (Naidu *et al.*, 1999).

Em 1999 pesquisas realizadas por Alander e colaboradores (Alander *et al.*, 1999) com $6,0 \times 10^{10}$ UFC da cultura *L. rhamnosus* GG administradas duas vezes ao dia durante 12 dias, em humanos, verificou-se que a aderência na mucosa intestinal ocorria e persistia por mais de uma semana, após a interrupção da administração oral da cultura. No entanto, as evidências científicas acumuladas até o momento, não demonstram claramente a colonização do intestino pelos lactobacilos e bifidobacterias administradas oralmente. Neste caso, para que os benefícios de longo prazo à saúde possam ocorrer, faz-se necessário uma suplementação contínua das culturas na dieta (Hoove 1993; Charteris *et al.*, 1998; Kleeman e Klaenhammer 1982; Speck 1978).

3.2.4. BACTERIOCINAS E AÇÃO ANTIMICROBIANA

As substâncias produzidas durante o processo fermentativo das bactérias lácticas contribuem não somente para a conservação, como também para o desenvolvimento das características sensoriais e reológicas dos produtos (Caplice e Fitzgerald, 1999). Além dos ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), dependendo das condições de crescimento, estas bactérias produzem outras substâncias, como o peróxido de hidrogênio, diacetil, etanol, dióxido de carbono, aldeído e as bacteriocinas, que promovem o fenômeno da antibiose, inibindo o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e/ou patogênicas em alimentos (Lindgren e Dodrogosz 1990; De Vuyst e Vandamme 1994a).

Bacteriocinas são polipeptídeos (simples ou complexos) antimicrobianos (Rattanachaikunsopon e Phumkhachom, 2000) sintetizados no ribossomo e secretados pela célula bacteriana (Chin *et al.*, 2001). Seu mecanismo de ação é através da formação de poros na membrana citoplasmática, o que leva a alteração de seu equilíbrio osmótico, resultando em morte celular (Cleveland *et al.*, 2001). Apresentam espectro de atividade amplo ou restrito contra bactérias Gram-positivas (De Vuyst e Vandamme 1994b), incluindo-se microrganismos patogênicos importantes, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. (incluindo *C. botulinum*), *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Contudo, não apresentam atividade contra microrganismos Gram-negativos (Hugas 1998) nem contra bolores e leveduras (Coventry *et al.*, 1995).

Além disso, essas substâncias não são consideradas tóxicas para seres humanos, uma vez que são produzidas por bactérias naturalmente presentes em alimentos e são degradadas no trato digestivo por enzimas de origem pancreática e gástrica (De Vuyst e Vandamme 1994c). Apresentam estabilidade ao tratamento térmico, sendo que algumas delas permanecem ativas mesmo após serem expostas às temperaturas de esterilização (Schillinger 1990). Geralmente são estáveis a pH ácido e neutro, indicando que essas substâncias são bem adaptadas ao ambiente de produção (Desmazeaud e Roissart 1997), não afetam a

qualidade sensorial do produto e são efetivas em baixa concentração, por exemplo, 10mg/kg (Rodgers 2001).

Embora muitas bacteriocinas tenham sido isoladas e caracterizadas nesta última década, somente um número limitado tem revelado potencial comercial para efetiva aplicação como bio-conservante, sendo a nisina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a única bacteriocina purificada e aprovada para alimentos em diversos países, inclusive no Brasil. Ela apresenta atividade antimicrobiana contra uma grande faixa de microrganismos Gram-positivos, incluindo as bactérias esporogênicas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Hurst 1983; Hurst 1981).

Outras bacteriocinas têm sido extensivamente avaliadas e exploradas comercialmente, como é o caso da pediocina PA-1, disponível, na forma de um produto fermentado (Alta™), e usada como um conservante para aumentar a vida útil de produtos cárneos prontos para consumo e inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas, principalmente *L. monocytogenes*. Já a lacticina 3147, que é uma bacteriocina que apresenta atividade em uma maior faixa de pH do que a nisina, tem expectativa para aplicação em alimentos não ácidos (Chen e Hoover 2003; Guerra e Castro 2002).

3 OBJETIVOS

- 3.1. Isolar culturas de lactobacilos e bifidobacterias dos produtos brasileiros provenientes de diferentes fabricantes utilizando-se meios diferenciais e seletivos;
- 3.2. Relacionar as principais características das culturas nestes meios para o primeiro passo de identificação das culturas probióticas;
- 3.3. Aplicar uma metodologia fenotípica simples e rápida para uma preliminar caracterização e identificação das bactérias ácido lácticas existentes nos produtos probióticos brasileiros (com ou sem alegação de propriedade funcional);
- 3.4. Identificar as culturas isoladas pela técnica molecular de ribotipagem utilizando o equipamento Riboprinter;
- 3.5. Avaliar e verificar se as culturas isoladas possuem requisitos mínimos para a classificação como probiótico;
- 3.6. Verificar e determinar o antagonismo de 10 culturas isoladas contra *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644;
- 3.7. Verificar se os produtos apresentam rótulos contendo a nomenclatura correta para as culturas declaradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS CULTURAS

4.1.1. AMOSTRAGEM

No período de março a maio de 2001 foram avaliados 11 tipos de produtos contendo lactobacilos e/ou bifidobactérias, comercializados no Brasil e coletados nos pontos de venda da cidade de Campinas (SP), incluindo 3 iogurtes, 7 leites fermentados e 1 mistura simbiótica em pó. Foram selecionados aqueles produtos que declaram em rótulo a presença desses microrganismos, sem levar em consideração o fato de haver ou não alegação de propriedade funcional como probiótico, uma vez que a legislação que normaliza o registro de alimentos funcionais no Brasil ainda era bastante recente e as empresas encontravam-se em fase de adequação. Foi também observado se os produtos apresentavam a discriminação das culturas em rótulo e se havia indicação da(s) espécie(s) presente(s). Na Tabela 2.1 estão descritos os 11 produtos analisados e algumas culturas declaradas.

Tabela 2.1. Relação dos produtos analisados, seus códigos de identificação e declarações das bactérias em rótulo.

Produto	Código de Identificação	Bactérias declaradas e quantidade
Fruty -iogurte com polpa de fruta	A	Fermento lácteo
Neston – Bebida láctea com iogurte, cereal e frutas	B	Fermentos lácteos
Sabores – iogurte natural	C	Fermentos lácteos
Batavito - Leite fermentado aromatizado	D	Lactobacilos vivos / fermento lácteo
Chamyto -Leite fermentado	E	Lactobacilos / fermentos lácteos
Parmalat - Leite fermentado	F	Lactobacilos
Digimon Leite fermentado)	G	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i>
Yakult - Leite fermentado	H	<i>L.casei</i> Shirota
LC1 Active – Bebida láctea fermentada	I	Lactobacilo LC1/ <i>L.casei</i>
Lactofos – Suplemento simbiótico à base de <i>Lactobacillus</i> e frutooligossacarídeos	J	<i>L.acidophilus</i> (750mi), <i>L.casei</i> (750mi), <i>L.lactis</i> (750mi), <i>B. bifidum</i> (750mi)
Biofibras - Bebida láctea fermentada com polpa de frutas e fibras	K	<i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>

4.1.2. ISOLAMENTO DAS CULTURAS

Os frascos das amostras de iogurtes e leites fermentados foram higienizados com algodão embebido em álcool 70% e, a seguir agitados para homogeneização. O produto simbiótico em pó, acondicionado em sachês de 6g cada, também foram higienizados e o conteúdo foi dissolvido em 54ml de água peptonada 0,1% estéril e cuidadosamente homogeneizado.

Para o isolamento dos microrganismos presentes nas amostras foram realizadas diluições decimais e feita a contagem padrão em placas, utilizando-se os seguintes meios de cultura, preparados no laboratório conforme orientação das referências bibliográficas citadas:

Bifidobacterium Medium 25 (BIM-25) (Munoa & Pares 1988), incubação a 37°C/72h em jarra anaeróbia, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (Anaerobac da Probac do Brasil). Esse meio é considerado seletivo para bifidobactérias, não permitindo o crescimento de lactobacilos, estreptococos ou lactococos.

Homofermentative Heterofermentative Differential Medium (HHD) (IDF/ISO/AOAC GROUP E-104, 1995), incubação a 37°C/72h em jarra anaeróbia, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (Anaerobac da Probac do Brasil). Esse meio não é seletivo e permite o crescimento de lactobacilos, bifidobactérias, estreptococos e lactococos eventualmente presentes. Entretanto, é diferencial para algumas espécies, permitindo uma triagem inicial das culturas:

- Colônias grandes com centro azul e circunferência branca – *L.acidophilus*
- Colônias azuis – *L.delbruecki* subsp *bulgaricus*, *S.thermophilus*
- Colônias brancas – bifidobactérias

Modified Bifidus Blood Agar (LA) (IDF/ISO/AOAC GROUP E-104, 1995), incubação a 37°C/72h em jarra anaeróbia, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (Anaerobac da Probac do Brasil). Esse meio não é seletivo e permite o crescimento de lactobacilos, bifidobactérias, estreptococos e lactococos. Entretanto, é diferencial para algumas espécies, permitindo uma triagem inicial das culturas:

- Colônias planas, grandes e acinzentadas – *L.acidophilus*
- Colônias elevadas, cor de chocolate – *B.bifidum* e *B.longum*
- Colônias elevadas, grandes e brancas - *L.delbruecki* subsp *bulgaricus*

O sistema de geração de anaerobiose utilizado (Anaerobac da Probac) produz uma atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico, não necessitando o emprego de catalizador. As jarras anaeróbicas utilizadas foram das marcas BBL, Permution, Oxoid e Almore.

A partir das placas utilizadas para a contagem, foram selecionadas aquelas com número de colônias entre 10 e 20, isolando-se todas as colônias com morfologia diferente. Estas colônias receberam um código (tipo e meio de origem) e todas as características das colônias no meio de origem foram registradas.

A partir das culturas ativadas e purificadas, as seguintes características fenotípicas foram inicialmente verificadas, para determinação dos gêneros: a) observação da morfologia, arranjo e motilidade das células ao microscópio, por montagens úmidas, b) determinação da coloração de Gram e c) teste de catalase.

4.1.3. CULTURAS PADRÃO DE COLEÇÃO

No desenvolvimento do trabalho foram utilizadas várias culturas padrão para comparação com os isolados de produtos. Essas culturas, descritas no Tabela 2.2, foram cedidas pela Korean Collection of Type Cultures (KCTC).

Tabela 2.2. Culturas padrão da Korean Collection of Type Cultures (KCTC) utilizadas no trabalho.

Código KCTC	Código ATCC*	Identidade da coleção	Nomenclatura atual
1047	9649	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
1058	7830	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
1121	-	<i>L. casei casei</i> (<i>L. bulgaricus</i>)	
3074	29599	<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
3109	393	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>
3111	4356	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
3138	332	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>L. johnsonii</i>
3139	-	<i>L. gasseri</i> (<i>L. acidophilus</i>)	
3141	-	<i>L. gasseri</i> (<i>L. acidophilus</i>)	-
3151	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
3165	27216	<i>Lactobacillus casei alactosus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
3216	15703	<i>B. adolescentis</i>	
3222	27534	<i>B. dentium</i>	
3223	27919	<i>B. pseudocatenulatum</i>	
3224	25526	<i>B. pseudolongum pseudolongum</i>	
3225	25525	<i>B. thermophilum</i>	
3234	25865	<i>B. pseudolongum globosum</i>	
3236	27535	<i>B. angulatum</i>	
3237	7469	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
3270	15697	<i>B. infantis</i>	
3229	27533	<i>B. suis</i>	

Continuação Tabela 2.2

Código KCTC	Código ATCC*	Identidade da coleção	Nomenclatura atual
3271	25910	<i>B asteroides</i>	
3274	27685	<i>B pullorum</i>	
3278	27539	<i>B catenulatum</i>	
3423	JCM 8219	<i>B merycicum</i>	
3425	-	<i>B ruminantun</i>	
3440	-	<i>B bifidum</i>	
3462	-	<i>B. gallicum</i>	
3465	27537	<i>B subtile</i>	
3467	27538	<i>B minimum</i>	
3479	27686	<i>B choerinum</i>	
3510	-	<i>L paracasei paracasei (L. casei casei)</i>	

*American Type Culture Collection

4.1.4. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Culturas isoladas dos produtos

Uma alçada de cada colônia foi cultivada por meio de estrias de esgotamento, em placas de Petri contendo o Ágar All Purpose Tween (APT – Merck 1.10453) ou Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS – Merck 1.10660). As placas foram incubadas a 37°C/72h sob anaerobiose e, após a incubação, toda a massa celular presente nas placas foi recolhida em 20ml de leite desnatado em pó reconstituído a 15%, utilizado como crioprotetor dos cultivos. Esse material foi dividido em alíquotas de 1ml em aproximadamente 20 criotubos, congelado e mantido à -80°C (criopreservadas) até o momento do uso.

Culturas padrão da KCTC

As culturas padrão liofilizadas foram primeiramente hidratadas com caldo MRS ou APT e, utilizando-se uma pipeta de Pasteur estéril, foi feita a homogeneização do conteúdo. As culturas hidratadas foram inoculadas em tubos de Ágar APT semi-sólido (com 0,05% cisteína-HCl e 0,3% de ágar) e também em placas contendo MRS suplementado com 0,05% de cisteína-HCl. Após a incubação a 37°C/72horas em anaerobiose, toda a massa celular presente nas

placas foi recolhida em 20ml de leite desnatado em pó reconstituído à 15% e congeladas da mesma forma descrita para as culturas isoladas dos produtos.

4.1.5. REATIVAÇÃO DAS CULTURAS PARA USO NO TRABALHO

As culturas isoladas dos produtos congeladas em leite 15% (-80°C) foram reativadas em 10ml de caldo MRS suplementado com 0,05% cisteína-HCl, incubado à 37°C/72horas em jarras anaeróbias com o sistema Anaerobac. Após o crescimento as culturas foram repicadas para placas de Petri contendo MRS (com 0,05% cisteína-HCl) por estrias de esgotamento, para purificação. A suplementação do MRS com cisteína foi feita segundo a orientação de Arroyo *et al.*, (1994), porque esse aminoácido, além de que servir como fonte de nitrogênio (Shah1997), também funciona como agente redutor, levando o potencial redox a uma condição mais favorável às bifidobactérias, anaeróbias estritas.

Para a reativação das culturas padrão de lactobacilos criopreservadas (a partir do leite à -80°C), foi feita a transferência do conteúdo total do criotubo (1-2ml) para 10ml de caldo MRS (com 0,05% cisteína-HCl) e incubado 37°C/48horas em anaerobiose. Foram então purificadas por estrias de esgotamento em placas de Ágar MRS (com 0,05% cisteína-HCl), incubadas nas mesmas condições.

Para a reativação as culturas de bifidobactérias, à partir do leite à -80°C, todo conteúdo do criotubo foi transferido para 10ml de caldo MRS (com 0,05% cisteína-HCl) e incubado 37°C/48horas em anaerobiose. Foram então purificadas por estrias de esgotamento em placas de LA (Modified Bifidus Blood Agar) ou BL (Blood Glucose Liver Agar) (Arroyo *et al.*, 1994).

4.1.6. TESTE DE ATIVIDADE DA ENZIMA FRUTOSE-6-FOSFATO-FOSFOCETOLASE (F6PPK)

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as culturas criopreservadas diretamente do estoque -80°C. As culturas originárias de colônias típicas de bifidobactérias nos meios seletivos ou diferenciais foram submetidas ao teste de atividade da enzima frutose-6-fosfato-fosfoacetolase (F6PPK). Essa enzima é

específica do gênero *Bifidobacterium*, não sendo detectada em outros gêneros bacterianos. As culturas padrão de bifidobactérias também foram analisadas em paralelo, como controle positivo do teste e, a cada batelada de análise, um controle branco não inoculado foi ainda utilizado, para a comparação visual. A metodologia utilizada é um teste colorimétrico qualitativo, indicada e descrita por Scardovi (1981) e Chevalier *et al.* (1990). O procedimento encontra-se sumariado a seguir:

- a) As culturas foram inoculadas em 20ml de caldo TPY (Caldo Tryptone Phytone Yeast Extract) e incubadas por 4 dias à 37°C em anaerobiose.
- b) Após o crescimento foram centrifugadas a 8.250 x g por 10 minutos em centrífuga (International Equipment Company – Série B20A). O “pellet” resultante foi lavado duas vezes com Tampão Fosfato Cisteína e ressuspendido em 2ml do mesmo tampão.
- c) As células foram lisadas por sonicação (Sonicador Desruptor de Células Ultra-Sônico Marca Unique) em banho de gelo (a enzima é termolábil) por até 15 minutos, com potência de 75%.
- d) Após o rompimento das células (visualizada em microscópio) e liberação da enzima, 0,25ml de cada um dos seguintes reagentes foi adicionado: Fluoreto de Sódio (NaF) e Frutose-6-Fosfato (preparada no momento do uso). No tubo branco foram adicionados 1,0ml de Tampão Fosfato Cisteína e 0,25ml do reagente NaF. Os tubos foram incubados por 37°C por 30 minutos.
- e) Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 1,5ml do reagente Hidroxilamina-HCl e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos.
- f) Adicionou-se 1,0ml dos reagentes Ácido Tricloroacético e Ácido Clorídrico 4N e manteve-se à temperatura ambiente por mais 5 minutos. Adicionou-se então 1,0ml do reagente Cloreto Férrico 5% e observou-se o desenvolvimento de cor. A coloração vermelho-violeta, desenvolvida imediatamente ou logo após até 1 minuto de repouso é indicativa de teste positivo, isto é a cultura isolada possui a enzima. A permanência da coloração amarela é indicativa de resultado negativo, ausência da F6PPK.

4.1.7. IDENTIFICAÇÃO OBTIDA POR MEIO DAS GALERIAS DO API 50CHL E 20A DAS CULTURAS

A identificação das espécies foi feita através de provas bioquímicas de fermentação de carboidratos, utilizando-se o “kit” API 50CHL e API 20A (BioMerioux). Para a realização do teste foi seguido o procedimento fornecido pelo fabricante sendo que as culturas foram retiradas para o teste dos criotubos a -80°C. A interpretação do perfil de fermentação de carboidratos foi feita através das chaves de identificação do próprio sistema API (APILAB PLUS – Versão 3.33, BioMerioux). O API 50 CHL foi utilizado para identificação das bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), através do perfil de fermentação de 49 carboidratos. O API 20A foi utilizado para a identificação das bifidobactérias, através de 20 testes para bactérias anaeróbias. As culturas padrão também foram submetidas aos testes, para comparação dos resultados.

O Anexo A apresenta a formulação e preparação de todos os reagentes e meios de cultura utilizados para o isolamento, manutenção, reativação das culturas isoladas (amostras e padrão) e o Anexo B apresenta todos os reagentes, concentrações e meio utilizado para o teste da F6PPK.

4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR RIBOTIPAGEM DAS CULTURAS

A ribotipagem das culturas foi feita utilizando-se o “RiboPrinter® Microbial Characterization System” (Qualicon, Wilmington, DE), cedido pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O processo é completamente automatizado e inclui a lise celular, a clivagem do DNA usando a enzima de restrição *EcoRI*, suplementada com um agente láctico, a separação das bandas, usando eletroforese em gel de agarose e o “southern blotting” modificado dos fragmentos, para hibridização com sondas genéticas marcadas (Silbert 2004). Todos os reagentes utilizados no ensaio fazem parte do “kit *Eco RI*” para bactérias lácticas e não exigem qualquer manipulação do analista.

4.2.1. PREPARO DAS CULTURAS PARA O ENSAIO

As culturas em estoque congelado (-80°C) foram reativadas em 20ml de caldo MRS (suplementado com 0,05% de cloridrato de cisteína) e incubadas sob anaerobiose a 35°C por 48h (lactobacilos) e 72h (bifidobactérias). Após a reativação as culturas passaram por três repiques de isolamento e purificação, no mesmo meio e condição de incubação.

4.2.2. RIBOTIPAGEM USANDO O EQUIPAMENTO RIBOPRINTER

A partir das placas do último repique, a análise de ribotipagem foi iniciada com a coleta de duas a três colônias isoladas, submetidas à duas diluições, de acordo com o manual de instrução do equipamento. A suspensão foi transferida para 40µL de solução tampão (“Sample Buffer” – Qualicon, Wilmington, DE, USA) com um bastão plástico descartável, fornecido pelo fabricante. O material foi homogeneizado com o auxílio de um agitador e, em seguida, 30µl foram transferidos para um tubo cônico, apropriado para introduzir as amostras no aparelho.

Na etapa seguinte foi feito o tratamento térmico das amostras, para inativação das nucleases presentes e preparação das células para a lise. Para a realização deste tratamento, foram realizados ciclos de aquecimento e resfriamento da amostra, segundo o programa da unidade de tratamento térmico (“Heat Treatment Station”), que é um equipamento que acompanha o aparelho de ribotipagem.

Após o tratamento térmico, 5µl dos reagentes de lise A e B (Qualicon, Wilmington, DE, USA) foram adicionados à cada amostra, para iniciar a ruptura da membrana das células. Em seguida as amostras foram inseridas no aparelho RiboPrinter® e processadas.

No aparelho, as seguintes etapas automatizadas foram realizadas:

1) Preparação do DNA - extração e posterior fragmentação com a enzima de restrição EcoRI, acrescida de 18 μ L do agente láctico (componente do Kit), específico para a identificação de bactérias ácido lácticas.

2) Separação e transferência - corrida em gel de eletroforese, que separou os fragmentos por gradiente de peso molecular, seguida da transferência destes fragmentos, que foram imobilizados em uma membrana de nitrocelulose pela técnica de “southern blotting” modificado.

3) Processamento da membrana - os fragmentos do DNA foram expostos a um tratamento químico-enzimático com uma sonda de DNA (derivada do RNA ribossomal de *E. coli*) e um marcador quimioluminescente, que revelou os fragmentos hibridizados.

4) Detecção - as imagens das membranas foram capturadas por uma máquina fotográfica, inserida no sistema e transferidas eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho. No computador a imagem de cada gel foi tratada e comparada com o banco de dados para a identificação das cepas. Cinco marcadores de peso molecular foram distribuídos no gel, permitindo que cada coluna, representando os dados da amostra, fosse normalizada de acordo com um marcador padrão, baseado na posição e intensidade das bandas (Hollis *et al.*, 1999).

Coeficientes de similaridade foram calculados pelo sistema de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e no peso relativo das bandas. Todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados com o mesmo ribogruppo. Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade \leq 0,92, foram considerados isolados diferentes com padrões de ribotipagem distintos (Bruce, 1996).

4.3 AVALIAÇÃO DO CUMPRIMENTO DE PRÉ-REQUISITOS MÍNIMOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS CULTURAS ISOLADAS COMO PROBIÓTICAS

4.3.1. TESTE DE RESISTÊNCIA AO pH

Foi realizado de acordo com Prasad *et al.* (1998), para verificar a sobrevivência em pH na faixa de 1,0 a 3,0, por 1 a 3 horas. O procedimento encontra-se descrito a seguir:

As culturas foram cultivadas em Caldo MRS por 16h sob anaerobiose e a suspensão obtida foi filtrada em filtro membrana de poro 0,45µm, sendo lavadas uma vez com Tampão Fosfato Salina (PBS). As células recolhidas na membrana foram suspendidas em PBS e utilizadas como inóculo para o teste de resistência ao pH.

Para tanto, 0,5ml do inóculo foi adicionado a 5ml de PBS e o pH foi ajustado em 1,0 – 2,0 e 3,0 com HCL, de acordo com Conway *et al.* (1987). As culturas foram mantidas a 37°C por 1, 2 e 3h, sendo submetidas à contagem em placas de MRS após cada período de contato. As placas de MRS foram incubadas a 37°C/72h sob anaerobiose, para enumeração dos sobreviventes.

4.3.1. TESTE DE TOLERÂNCIA À BILE

As cepas foram submetidas ao teste de tolerância à bile, nas concentrações de 1, 0,6 e 0,2%, realizado de acordo com o procedimento descrito por Klaenhammer & Kleeman (1981) e Prasad *et al.* (1998), apresentado a seguir:

Para obtenção do inóculo, as culturas foram cultivadas em caldo MRS a 35°C/24h sob anaerobiose. O caldo foi filtrado em filtro membrana com poro de 0,45µm e os filtros foram lavados com PBS (tampão fosfato salina pH 3,0). O material suspenso em PBS foi incubado a 37°C por 3 horas e, em seguida, utilizado como inóculo do teste.

Foram feitas diluições decimais e várias diluições foram inoculadas por plaqueamento em gotas no Ágar MRS (controle) e Ágar MRS suplementado com 0,2, 0,6 e 1,0% de sais biliares (Oxgall). As placas foram incubadas a 35°C/72h e, após a incubação, foi feita a contagem dos sobreviventes.

4.3.3. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

A produção de bacteriocinas foi avaliada pelo método de difusão em poços conforme Tagg e McGiven (1971), descrito por Moreno *et al.*, (1999) e apresentado a seguir:

Uma sobrecamada de 4,5ml de MRS semi-sólido (0,75% de agar), previamente inoculado com 0,5ml da cultura indicadora ou sensível, foi depositada sobre agar MRS contido em placas de Petri. Após a solidificação e secagem do meio, poços de aproximadamente 5mm foram perfurados. Os sobrenadantes (extratos de bacteriocinas, 80 a 100µl) foram depositados nos poços. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. A formação de zonas de inibição (halo) em torno dos poços foi considerada indicativa de produção de bacteriocina.

Os extratos de bacteriocinas foram obtidos após centrifugação (13.000rpm/10min) das culturas em fase exponencial de crescimento. Para eliminar o efeito da ação do ácido láctico na cultura indicadora, o pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5-6,8 com NaOH 0,1N. O sobrenadante foi submetido a um tratamento em banho-maria a 95°C/10min, para eliminação de células viáveis.

4.3.4. TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

A sensibilidade de bactérias patogênicas Gram negativas, *Salmonella typhimurium* e *E. coli* O157:H7 e Gram positivas, *S.aureus* e *L.monocytogenes* às culturas lácticas isoladas dos diferentes produtos probióticos também foi avaliada, utilizando-se o método de difusão em poços. Neste ensaio, o sobrenadante das culturas produtoras não foi submetido ao tratamento térmico de 95°C/10min,

ocasionando o desenvolvimento de células viáveis. Assim, a inibição se presente, pode ser decorrente de outros fatores inibitórios não bacteriocinogênicos.

As culturas patogênicas utilizadas no estudo foram cedidas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL e são apresentadas a seguir: *E. coli* O157:H7 (ATCC 11229), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). Todas as culturas foram mantidas sob refrigeração (4°C), em ágar tripticase de soja (TSA) para *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (com suplementação de 0,5% de extrato de levedura) e em ágar infusão cérebro coração (BHI) para *Staphylococcus aureus*.

Para a reativação dos microrganismos patogênicos o caldo MRS (de Man, Rogosa Sharpe Broth, Merck), foi utilizado. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições aeróbias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização inicial DAS CULTURAS ISOLADAS

Os resultados da caracterização inicial das culturas sobreviventes isoladas dos produtos e das culturas padrão encontram-se nas Tabelas 2.3 e 2.4. Todas foram caracterizadas como Gram positivas, imóveis e catalase negativas, características típicas das bactérias lácticas e bifidobactérias.

Os cocos foram considerados como *Streptococcus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc*. Os bastonetes como *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, diferenciados pelo teste da enzima frutose-6-fosfato-fosfoacetolase (F6PPK), positivo para bifidobactérias e negativo para lactobacilos. Nenhuma das culturas com morfologia em bastonetes, isoladas dos produtos apresentou atividade de F6PPK, sendo, portanto, consideradas como *Lactobacillus*. Dentre as culturas padrão, todas as bifidobactérias apresentaram teste de F6PPK positivo

Tabela 2.3. Resultados da caracterização inicial das culturas isoladas dos produtos e das culturas padrão KCTC.

Produto/Cultura	Gram e Morfologia das células	Motilidade	Catalase	F6PPK
Meio de isolamento				
1. Biofibras 2 – LA	Positivo (Cocos/cocobacilos)	-	-	-
2. Biofibras 5 - LA	Positivo (Bastonetes pequenos)	-	-	-
3. Biofibras 9 – BIM	Positivo (Bastonetes médios)	-	-	-
4. Biofibras 10 – BIM	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
5. Chamyto 1 – HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
6. Chamyto 2 – HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
7. Digimon 1 – HHD	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
8. Digimon 2 – HHD	Positivo (Bastonetes longos)	-	-	-
9. Digimon 4 – LA	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
10. Digimon 5 – LA	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
11. Digimon 6 – LA	Positivo (Bastonetes finos e longos)	-	-	-
12. Digimon 7 – LA	Positivo (Cocobacilos)	-	-	-
13. Fruty 1 - HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
14. Fruty 2 - HHD	Positivo (Cocos)	-	-	-
15. Lactofos 1 – HHD	Positivo (Cocos)	-	-	-
16. Lactofos 2 – HHD	Positivo (Bastonetes pequenos)	-	-	-
17. Lactofos 3 – HHD	Positivo (Bastonetes médios)	-	-	-
18. Lactofos 4 – BIM	Positivo (Bastonetes pequenos)	-	-	-
19. Lactofos 5 – LA	Positivo (Bastonetes longos)	-	-	-
20. Lactofos 6 – LA	Positivo (Bastonetes médios)	-	-	-
21. Lactofos 7 – LA	Positivo (Bastonetes pequenos)	-	-	-
22. LC1 1 – HHD	Positivo (Bastonetes longos)	-	-	-
23. LC1 2 - HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
24. LC1 5 - HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
25. LC1 8 - LA	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
26. Batavito 1 – HHD	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
27. Batavito 2 – HHD	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
28. Neston 1 – HHD	Positivo (Bastonetes)	-	-	-
29. Neston 2 – HHD	Positivo (Cocos)	-	-	-
30. Parmalat 1 – HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
31. Parmalat 2 – HHD	Positivo (Cocos)	-	-	-
32. Sabores 1 – HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
33. Sabores 2 – HHD	Positivo (Bastonetes curtos)	-	-	-
34. Yakult 1 – HHD	Positivo (Bastonetes)	-	-	-

Tabela 2.4. Resultados da caracterização inicial das culturas padrão KCTC.

	Cultura/Meio de isolamento	Morfologia das células	Motilidade	Catalase	F6PPK
1.	3109 <i>L.casei casei</i> (APT)	Bastonetes finos e longos	-	-	-
2.	3141 <i>L.gasseri</i> (<i>L.acidophilus</i>) (APT)	Bastonetes pequenos	-	-	-
3.	3074 <i>L.casei tolerans</i> (LA)	Bacilos	-	-	-
4.	3138 <i>L.gasseri</i>	Bastonetes longos e finos	-	-	-
5.	3510 <i>L.paracasei paracasei</i> (LA)	Bastonetes pequenos	-	-	-
6.	1047 <i>L.delbrueckii delbrueckii</i> (APT)	Bastonetes pequenos e finos	-	-	-
7.	3165 <i>L.casei alactosus</i> (APT)	Bastonetes pequenos finos	-	-	-
8.	3237 <i>L.casei rhamnosus</i> (APT)	Bastonetes longos e finos	-	-	-
9.	3111 <i>L.acidophilus</i> (LA)	Cocos e bastonetes	-	-	-
10.	3151 <i>L.acidophilus</i> (APT)	Cocos duplos unidos e bastonetes grandes	-	-	-
11.	1121 <i>L.casei casei</i> (<i>L.bulgaricus</i>) (APT)	Bastonetes médios finos	-	-	-
12.	3139 <i>L.gasseri</i> (<i>L.acidophilus</i>) (APT)	Bastonetes longos e finos	-	-	-
13.	1058 <i>L.delbrueckii lactis</i> (<i>L.leichmannii</i>) (APT)	Bastonetes pequenos finos	-	-	-
14.	3223 <i>B.pseudocatenulatum</i>	Bastonetes Gordos	-	-	-
15.	3222 <i>B.dentium</i>	*	-	-	+
16.	3225 <i>B.thermophilum</i>	*	-	-	+
17.	3236 <i>B.angulatum</i>	Bastonetes/Cocobacilos	-	-	+
18.	3234 <i>B.pseudolongum globosum</i> (BL)	Bastonetes pequenos	-	-	+
19.	3224 <i>B.pseudolongum pseudolongum</i> (BL)	Bastonetes e cocobacilos	-	-	+
20.	3271 <i>B.asteroides</i>	Bastonetes pequenos	-	-	*
21.	3278 <i>B.catenulatum</i>	Bastonetes	-	-	+
22.	3465 <i>B.subtile</i> (LA e BL)	Bacilos pequenos	-	-	+
23.	3479 <i>B.choerinum</i> (LA e BL)	Bastonetes grandes e gordos e bastonetes	-	-	+
24.	3270 <i>B.infantis</i>	Bastonetes	-	-	+
25.	3423 <i>B.merycicum</i> (LA)	Bastonetes grandes e longos	-	-	+
26.	3425 <i>B.ruminantum</i>	Cocos	-	-	+
27.	3467 <i>B.minimum</i>	Bacilos	-	-	+
28.	3216 <i>B.adolescentis</i>	Bastonetes grandes	-	-	+
29.	3440 <i>B.bifidum</i>	Bastonetes grandes	-	-	+
30.	3274 <i>B.pullorum</i>	Cocobacilos	-	-	+
31.	3462 <i>B.gallicum</i> (LA e BL)	Bastonetes pequenos	-	-	+

*Não realizado

Foram isoladas 53 culturas dos 11 produtos analisados selecionados nos meios de isolamento pelas características morfológicas das colônias (tamanho, forma, cor, borda, brilho e viragem do meio). O Anexo C mostra os produtos, as culturas isoladas, as principais características das culturas nos meios de isolamento, alguns dados fornecidos nas embalagens (fabricante, data de fabricação e validade), bem como as datas de análise e isolamento das culturas. O Anexo D mostra algumas morfologias de colônias encontradas nos diferentes meios de isolamento e no Anexo E as fotos obtidas na coloração de Gram das culturas isoladas.

Das 55 culturas isoladas somente 36 mantiveram-se ativas (65%), enquanto que 17 (34%) não cresceram nas repicagens sucessivas de isolamento ou não apresentaram crescimento após o descongelamento. Essa taxa de perda não foi considerada incomum, pois Kandler e Weiss (1986), também descreveram perda de lactobacilos quando submetidos a congelamento ou repicagens. Recentemente, trabalhando com culturas de *Lactobacillus helveticus* isoladas do soro-fermento, Rossi (2001) mencionou que, de 35 culturas, somente 29 (82%) apresentaram reativação após o descongelamento e repicagens. Temmerman *et al* (2002), identificando 323 bactérias isoladas de 55 produtos probióticos, coletados em oito países da Europa, observaram perda de 55 (17%) de isolados incluindo algumas leveduras.

A utilização das características da colônia no meio de isolamento (LA, HHD ou BIM-25) como critério na seleção de lactobacilos ou bifidobactérias apresentou algumas dificuldades, observando-se variações na coloração, intensidade de brilho e presença de pontos centrais, entre outras, com o tempo de incubação e local de crescimento da colônia nestes meios. Nem todas as culturas isoladas como sendo de uma ou outra espécie no meio de isolamento foram seguramente identificadas. Isso foi particularmente verdadeiro para as culturas isoladas como bifidobactérias no meio BIM-25.

A enumeração diferencial de bactérias *starter* do iogurte em meios convencionais tem sido baseada na morfologia da colônia (Singh *et al.*, 1980; Matalon e Sandine 1986), mas, devido a diferenças entre as culturas de uma

mesma espécie, os meios diferenciais não conseguem fornecer uma boa reprodutibilidade, quando testado em diferentes laboratórios. Matalon e Sandine (1986), incluem nesta categoria o meio diferencial de Lee *et al.*, (1974) e o LB ágar, indicados para a enumeração de *L. bulgaricus* em iogurte e que permitiriam separar *S. thermophilus* de *L. bulgaricus* baseado na morfologia da colônia. Nebra e Blanch (1999), destacam alguns fatores que impedem o uso rotineiro dos meios para o monitoramento de bifidobactérias usadas como indicadores fecais ou para enumeração em produtos de leite: a composição complexa, que incluem antibióticos esterilizados por filtração, vários ingredientes e suplementos; os longos períodos de incubação (até 72 horas) e os baixos níveis de distinção das bactérias, especialmente as bifidobactérias.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS ISOLADAS COM O KIT API 50CHL

Os resultados da identificação das culturas com o API 50CHL são apresentados na Tabela 2.5, que mostra a espécie identificada, a qualidade da identificação e a taxa de significância (%ID).

Tabela 2.5. Resultados da identificação das culturas com o API 50CHL.

Cultura	Qualidade da identificação	Resultado da identificação (conforme emitido pelo programa)	Taxa %
Biofibras 2 – LA	Boa	<i>Str. saliv. thermophilus</i>	98,7
Biofibras 3 – LA	Muito boa	L. buchneri	99,3
Biofibras 5 – LA	Baixa discriminação	<i>Str. saliv. thermophilus</i> <i>Leuconostoc mesen. cremoris</i>	50,2 48,6
Biofibras 7 – HHD	Boa	<i>Str. saliv. thermophilus</i>	98,7
Biofibras 9 – BIM	Boa	<i>L. para paracasei</i>	95,9
Biofibras 10 – BIM	Muito boa	<i>L. para paracasei</i>	99,8
Chamyto 1 – HHD	Baixa discriminação	<i>Leuco. mesen. cremoris</i> <i>L. delb. bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i>	89,0 6,7 4,0
Chamyto 2 – HHD	Perfil inaceitável	<i>L. para paracasei</i>	-
Digimon 1 – HHD	Muito boa	<i>L. para paracasei</i>	99,6
Digimon 2 – HHD	Boa	<i>Leuco. mesen. cremoris</i> <i>L. helveticus</i>	97,1 2,8
Digimon 3 – HHD	Boa	<i>Leuco. mesen. cremoris</i> <i>L. helveticus</i>	98,2 1,6
Digimon 4 – LA	Aceitável	<i>L. para paracasei</i>	98,4

Continuação Tabela 2.5

Cultura	Qualidade da identificação	Resultado da identificação (conforme emitido pelo programa)	Taxa %
Digimon 5 – LA	Boa para o gênero	<i>L. curvatus</i>	80,7
		<i>L. plantarum</i>	19,1
Digimon 6 – LA	Muito boa	<i>Leuco. mesen. cremoris</i>	99,7
		<i>L. helveticus</i>	0,1
Digimon 7 – LA	Baixa discriminação	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	66,1
		<i>Lactococcus lactis lactis</i>	18,3
		<i>L. brevis</i>	13,3
Digimon 8 – LA	Perfil duvidoso	<i>Leuco. mesen. cremoris</i>	78,4
		<i>L. frutivorans</i>	9,9
		<i>L. delb. delb.</i>	9,8
		<i>L. delb. bulgaricus</i>	1,6
Fruty 1 – HHD	Muito boa para o gênero	<i>L. rhamnosus</i>	85,1
		<i>L. para paracasei</i>	14,8
Fruty 2 – HHD	Boa	<i>Str. saliv. thermoph</i>	98,2
		<i>L. delb. delb</i>	0,6
Lactofos 1 – HHD	Aceitável	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	87,8
Lactofos 2 – HHD	Muito boa para o gênero	<i>L. rhamnosus</i>	89,9
		<i>L. para paracasei</i>	10,0
Lactofos 3 – HHD	Identificação não válida	<i>L. acidophilus</i>	68,8
		<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	8,8
		<i>Pediococcus sp</i>	5,7
Lactofos 4 – BIM	Muito boa para o gênero	<i>L. rhamnosus</i>	77,8
		<i>L. para paracasei</i>	22,1
Lactofos 5 – LA	Aceitável para o gênero	<i>L. delb. lactis</i>	45,8
		<i>L. acidophilus</i>	33,9
Lactofos 6 – LA	Baixa discriminação	<i>L. delb. lactis</i>	26,3
		<i>Lactococcus lactic lactis</i>	25,8
		<i>Pediococcus sp</i>	21,0
		<i>L. acidophilus</i>	18,8
Lactofos 7 – LA	Boa	<i>L. rhamnosus</i>	99,1
LC1 1 – HHD	Aceitável para o gênero	<i>L. acidophilus</i>	85,6
		<i>L. lactis cremoris</i>	0,1
LC1 2 – HHD	Boa	<i>Leuco. mesen. cremoris</i>	98,6
		<i>Str. saliv. thermoph.</i>	0,8
LC1 5 – HHD	Aceitável	<i>Leuconostoc lactis</i>	89,9
		<i>L. fermentum</i>	4,7
LC1 8 – LA	Perfil inaceitável	<i>L. acidophilus</i>	-
		<i>Pedio. Damnosus</i>	-
Batavito 1 – HHD	Boa	<i>Str. saliv. thermoph.</i>	98,7
Batavito 2 – HHD	Boa para o gênero	<i>L. para paracasei</i>	60,2
		<i>L. para paracasei</i>	34,9
Neston 1 – HHD	Boa	<i>Str. saliv. thermoph.</i>	98,2
		<i>L. delb. delb.</i>	0,6
Neston 2 – HHD	Muito boa para o gênero	<i>L. fructivorans</i>	70,9
		<i>L. delb. bulgaricus</i>	20,1
		<i>L. lindneri</i>	6,5
Parmalat 1 – HHD	Boa	<i>L. para paracasei</i>	99,9
Sabores 1 – HHD	Muito boa	<i>L. delb. bulgaricus</i>	99,4
Yakult 1 – HHD	Aceitável	<i>L. para paracasei</i>	99,1

Quanto a qualidade de identificação das culturas pelo Kit API 50CHL os resultados estão apresentados na Tabela 2.6. As culturas foram identificadas em nível de espécie, porém, em alguns casos, com baixa discriminação, perfil duvidoso ou perfil inaceitável.

Tabela 2.6 Qualidade referente à escolha taxonômica das culturas analisadas

Qualidade do teste	Número de culturas	%
Muito boa identificação para o gênero	4	11,11
Muito boa identificação	5	13,89
Boa identificação para o gênero	2	5,55
Boa identificação	11	30,55
Identificação aceitável para o gênero	2	5,55
Identificação aceitável	4	11,11
Inaceitável identificação	2	5,55
Baixa discriminação	4	11,11
Perfil duvidoso	1	2,78
Identificação não válida	1	2,78

Tynkkynen *et al.* (1999), utilizando o mesmo sistema para a identificação de 24 culturas de *L. rhamnosus* e *L. casei*, também obteve perfis inadequados: para 13 culturas (54%) o nível de identificação foi bom a excelente; para 11 culturas (45%) o nível de identificação foi considerado duvidoso ou inaceitável devido a reações de fermentação atípicas.

Quanto as identificações os seguintes gêneros foram encontrados: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*.

Nos produtos que declaravam a presença de fermentos lácteos (iogurtes Fruty, Neston e Sabores) foram isolados os fermentos tradicionais na produção de iogurtes, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, bem como uma cultura de *Lactobacillus rhamnosus*. Em uma das amostras foi isolada uma cultura de *Lactobacillus fructivorans*, porém, esse isolado provavelmente faz parte da microbiota deteriorante do produto.

Nos produtos que declaravam a presença de *Lactobacillus* sp (leites fermentados Batavito, Chamyto e Parmalat) foi encontrada um tipo de lactobacilo, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, anteriormente classificado como *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*. Foi também isolada uma cultura de *Streptococcus thermophilus* e de *Leuconostoc mesenteroides cremoris*, embora não declaradas nos rótulos dos produtos.

No leite fermentado Digimon, que declara a presença de *L. acidophilus* e *L. casei*, foram isoladas 8 culturas, 2 identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 1 identificada como *Lactobacillus curvatus*, 4 identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e 1 identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Não foram isoladas culturas de *L. acidophilus*, sendo provável que a população dessa espécie se encontrasse em menor número na amostra analisada ou foram perdidas nos repiques de isolamento ou nas reativações à partir do leite congelado ou ainda não foram adicionadas ao produto.

No leite fermentado Yakult, que declara a presença de *L. casei*, foi isolada uma cultura, identificada como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, nome corrente de *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*.

Na bebida láctea fermentada LC1, que declara a presença de *L. casei*, foram isoladas 8 culturas, porém, 4 não cresceram nos repiques subseqüentes. As 4 culturas remanescentes não foram identificadas como *L. casei*, sendo 2 de *L. acidophilus*, 1 de *Leuconostoc lactis* e 1 de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* não declaradas.

No suplemento simbiótico Lactofós, que declara a presença de *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* e *Bifidobacterium bifidum*, foram isoladas 7 culturas, 1 identificada como *Lactococcus lactis lactis*, 1 identificada como *L. acidophilus*, 3 identificadas como *L. rhamnosus* (nome corrente de *L. casei* subsp. *rhamnosus*) e 2 identificadas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Não foi isolado *B. bifidum*, embora a cultura J-4 tenha sido selecionada no Ágar BIM, considerado seletivo para bifidobactérias. Essa cultura foi identificada como *L. rhamnosus*, apresentou um perfil bioquímico considerado muito bom no gênero *Lactobacillus* e não apresentou atividade de frutose-6-fosfato fosfocetolase, típica

do gênero *Bifidobacterium*, demonstrando que o ágar BIM permitiu o crescimento de lactobacilos.

Na bebida láctea fermentada Biofibras, que declara a presença de *L.acidophilus* e *Bifidobacterium* sp, foram isoladas 10 culturas, 4 perdidas no primeiro repique. As demais foram identificadas como *Streptococcus salivaricus. thermophilus* (3), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (2) e *Lactobacillus buchneri* (1). Não foram detectadas culturas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, sendo provável que a população dessas espécies poderia estar em menor número na amostra analisada ou foram perdidas nos repiques de isolamento ou nas reativações à partir do leite congelado ou não foram realmente adicionadas ao produto.

Os resultados obtidos são similares aos relatados em outros estudos. Schillinger (1999), em seu estudo com isolados de *Lactobacillus* de vários produtos de leite revelou que somente um dos oito iogurtes investigados continha um representante típico de *L. acidophilus*. Por outro lado, na maioria dos produtos que tinham alegação de propriedade funcional como probióticos, os isolados foram identificados como *L. acidophilus*. De acordo com o rótulo dos fabricantes, cinco dos oito iogurtes investigados continham Biogarde® ou Bioghurt® (culturas constituídas de *L. acidophilus* e/ou *Bifidobacterium bifidum* em adição a *S. thermophilus*) (Tamine *et al.*, 1995). O lactobacilo isolado de dois desses produtos, no entanto, mostraram características fenotípicas do grupo *L. casei* e foram claramente identificadas como *L. rhamnosus* pela técnica molecular de hibridização DNA-DNA. Obviamente, culturas diferentes de *Lactobacillus* daquelas culturas Biogarde® ou Bioghurt® foram usadas na fabricação desses dois iogurtes demonstrando que a rotulagem dos produtos estavam inadequadas. Culturas de *Lactobacillus* isoladas de outros três produtos (rotulados contendo cultura Biogarde®) se mostraram fenotipicamente muito similares com *L. acidophilus*, porém, estudos moleculares de homologia DNA revelaram que as culturas eram espécies de *L. johnsonii*. No leite fermentado G que declara a presença de *L. acidophilus* as culturas isoladas apresentaram características fenotípicas do grupo *L. casei* o que leva a concluir que a cultura foi perdida ou não foi adicionada

conforme descrito no rótulo do produto. O *L. acidophilus* foi encontrado em dois produtos sendo que somente em um deles sua presença é mencionada no rótulo.

Gilliland *et al.* (1985) e Noh *et al.* (1997) mencionam que uma outra espécie muito usada para a fabricação de iogurtes é o *L. casei*. Seis de treze produtos probióticos continham culturas fenotipicamente classificadas como *L. casei*. Com base na homologia DNA a maioria das culturas incluindo *L. casei* Shirota e *L. casei* Actimel foram identificadas como membros da espécie *L. paracasei* de acordo com a nomenclatura corrente. O *Lactobacillus* GG foi chamado de *L. casei* em muitas publicações (Isolauri *et al.*, 1991; Sarem-Damerdjji *et al.*, 1995). A análise de homologia DNA mostrou que esta cultura é o *L. rhamnosus*. O *L. paracasei paracasei* foi encontrado em seis produtos (54%). No produto Biofibras a cultura não é relatada em rótulo, nos produtos Chamyto, Batavito e Parmalat somente o gênero é especificado no rótulo, no produto Digimon a nomenclatura está ultrapassada, e no produto Yakult a cultura também foi identificada como relatado por Gilliland *et al.* (1985) e Noh *et al.* (1997).

Temmerman *et al.* (2002), citam em seus resultados de isolamento de bactérias probióticas em diferentes produtos, que somente seis apresentavam todas as espécies indicadas nos rótulos. Em 19 produtos, a espécie isolada foi totalmente diferente das mencionadas nos seus rótulos. A espécie mais freqüentemente descrita entre os suplementos alimentares foi o *Enterococcus faecium* seguido do *L. rhamnosus*. Em 6 produtos dos quais o *E. faecium* foi encontrado, somente dois declaravam a espécie em rótulo. *L. acidophilus*, declarado em 22 rótulos de suplementos alimentares, foi isolado em apenas dois. De 13 suplementos alimentares que declaravam bifidobactérias, analisados duas vezes usando-se dois diferentes meios para o isolamento seletivo (TOS e MCA), somente 3 apresentaram culturas de bifidobactérias. Neste estudo, das culturas isoladas do meio seletivo BIM-25, nenhuma foi confirmada como *Bifidobacterium*, indicando que este meio permite o crescimento de outras bactérias lácticas não devendo ser classificado como meio seletivo. Nas conclusões relatadas por Temmerman *et al.* (2002), temos que de 25 produtos de leite, dois (8%) continham todas as espécies declaradas, 10 (40%) continham espécies diferentes das

declaradas e 16 (64%) declaravam mais espécies do que as encontradas. Os resultados fenotípicos obtidos para os produtos analisados com relação as culturas isoladas e informações encontradas nos rótulos dos produtos estão apresentados na Tabela 2.7 e podem ser comparadas com os resultados de Temmerman *et al.* (2002).

Tabela 2.7 Sumário dos resultados encontrados para os produtos analisados, com base nos relatos fenotípicos obtidos.

Descrição	Produto
Nº de produtos analisados	11
Células viáveis ativas	36 (65,45%)
Células perdidas após o isolamento ou durante as repicagens	19 (34,54%)
Rótulos contendo somente a espécie declarada	1 (9,09%) Yakult
Rótulos contendo outras espécies diferentes das declaradas (incluindo-se as culturas startes <i>S. thermophilus</i> e <i>L. delb. bulgaricus</i>)	10 (90,91%)
Mais freqüente espécie declarada	<i>L. casei</i> e <i>L. acidophilus</i>
Mais freqüente espécie isolada	<i>L. para paracasei</i> (54,54%)
Espécie probiótica encontrada mas não alegada em rótulo	<i>L. rhamnosus</i>

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS PADRÃO PELO KIT API 50CHL e API 20A

Os resultados da identificação das culturas padrão de *Lactobacillus* com o Kit API 50 CHL podem ser visualizados na Tabela 2.8. Os resultados da identificação das bifidobactérias com o Kit API 20A podem ser visualizados na Tabela 2.9.

De sete culturas de bifidobactérias submetidas à identificação, nenhuma foi corretamente identificada pelo API 20A em nível de espécie. Em nível de gênero, 2 foram detectadas como *Bifidobacterium* sp, porém, com baixa discriminação e baixa probabilidade (11,4 e 0,3%) e uma, *B. adolescentis*, foi corretamente identificada, com muito boa identificação, 99,5% de probabilidade para o gênero.

Esses dados indicam a quase completa inadequação das chaves desse “kit” para bifidobactérias.

Tabela 2.8 Resultados da identificação das culturas padrão de *Lactobacillus* com o Kit API 50CHL

Código KCTC/ATCC	Identificação da coleção	Qualidade da identificação	Resultado da identificação (conforme emitido pelo programa)	Taxa %
3109/393	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	Perfil inaceitável	<i>L. para paracasei</i> <i>L. rhamnosus</i>	-
1121	<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	Muito boa	<i>L. rhamnosus</i>	99,5
3074/29599	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Baixa discriminação	<i>L. helveticus</i> <i>Lc lactis cremoris</i>	62,0 37,3
3165/27216	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Boa identificação	<i>L. para paracasei</i>	98,9
3237/7469	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Muito boa para o gênero	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. para paracasei</i>	94,2 5,7
1047/9649	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Boa identificação	<i>L. para paracasei</i>	99,4
1058/7830	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Aceitável	<i>L. delb. delb</i> <i>L. acidophilus</i>	80,0 8,3
3141	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Perfil duvidoso	<i>Str. saliv. thermophilus</i>	98,8
3138/332	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Boa para o gênero	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delb. delb.</i>	86,6 11,2
3111/4356	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Muito boa para o gênero	<i>L. para paracasei</i> <i>L. para paracasei</i>	60,7 39,2

Tabela 2.9 Resultados da identificação das culturas padrão de *Bifidobacterium* com o Kit API 20A.

Código KCTC/ATCC	Identificação da coleção	Qualidade da identificação	Resultado da identificação (conforme emitido pelo programa)	Taxa %
3223/27919	<i>B. pseudocatenuatum</i>	Perfil duvidoso	<i>Clostridium</i> spp <i>C. histolyticum</i>	53,1 32,6
3234/25865	<i>B. pseudolongum globosum</i>	Baixa discriminação	<i>L. fermentum</i> <i>Actino. meyeri/odont.</i> <i>Bifidobacterium</i> sp	54,0 45,5 0,3
3224/25526	<i>B. pseudolongum pseudolongum</i>	Baixa discriminação	<i>Bifidobacterium</i> sp <i>Actinomyces israelii</i>	80,8 19,1
3229/27533	<i>B. suis</i>	Boa identificação	<i>Eubacterium lentum</i> <i>Actinomyces viscosus</i>	94,2 3,0
3479/27686	<i>B. choerinum</i>	Baixa discriminação	<i>L. fermentum</i> <i>Propioni. prop./avid</i> <i>Actino. meyeri/odont.</i>	53,4 42,1 2,2
3216/15703	<i>B. adolescentis</i>	Muito boa identificação	<i>Bifidobacterium</i> sp	99,5
3462	<i>B. gallicum</i>	Baixa discriminação	<i>Actino. naeslundii</i> <i>Bifidobacterium</i> sp	87,1 11,4

De 10 culturas de *Lactobacillus* submetidas à identificação com o API 50CHL, 8 (80%) resultados não coincidiram com a identidade declarada pela coleção de culturas: *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 foi identificado como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus* (perfil inaceitável) *Lactobacillus casei* subsp. *casei* KCTC 1121 foi identificado como *Lactobacillus rhamnosus* (identificação muito boa), *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 29599 foi identificado como *Lactobacillus helveticus* ou *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (baixa discriminação), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649 foi identificado como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (boa identificação), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* foi identificado como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (identificação aceitável), *Lactobacillus johnsonii* ATCC 332 foi identificado como *lactobacillus acidophilus* (identificação boa para o gênero) e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi identificado como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (identificação muito boa para o gênero).

Esses dados não diferem dos obtidos por outros pesquisadores na literatura. Rossi (2001) relatou que a utilização da galeria API não permitiu verificar a espécie de todos os lactobacilos isolados no seu estudo, que foram então, classificados somente em nível de gênero como *Lactobacillus* sp, nestas circunstâncias somente três identificações obtiveram resultados considerados bons e muito bons para o gênero (KCTC 3138, 3237 e 3111 respectivamente).

Resultados citados por Yeung *et al.* (2002), revelaram discrepâncias na identificação de 26 de 58 espécies de culturas probióticas comerciais com o API 50CHL, principalmente na identificação de *L. acidophilus* e *L. casei*. Em grande parte dos casos, a cultura declarada como *L. acidophilus* foi identificada o *L. crispatus*, uma das espécies do grupo *L. acidophilus*. Esse grupo consiste do *L. acidophilus* stricto sensu (A1), *L. crispatus* (A2), *L. amylovorus* (A3), *L. gallinarum* (A4), *L. gasseri* (B1) e *L. johnsonii* (B2). Essas espécies são estreitamente relacionadas e apresentam similaridade fenotípica muito grande, o que torna a sua diferenciação difícil. Kandler e Weiss (1986), descrevem que o *L. acidophilus* e o *L. gasseri* são encontrados em habitat similares e não podem ser distinguidos por critérios fenotípicos simples. Isso pode explicar porque muitas culturas de *L.*

acidophilus comerciais têm sido identificadas como outras espécies de *Lactobacillus*. Considerando as identificações obtidas neste estudo, as culturas de *L. gasseri* (KCTC 3141) e *L. acidophilus* foram identificadas como *S. salivaricus termophilus* e *L. paracasei paracasei* respectivamente. A cultura *L. johnsonii* (KCTC 3138) foi a única que se enquadrou no grupo *acidophilus* e foi identificada como *L. acidophilus*, mostrando que a identificação por caracteres fenotípicos não deve ser aplicada a este grupo de microrganismo.

Nigatu (2000), relata que o API 50CHL é um dos procedimentos mais utilizados para a identificação fenotípica de espécies de *Lactobacillus*. Diferentes estudos (Molin *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 1995b) tem mostrado a reprodutibilidade e confiabilidade desse “kit” como ferramenta para a taxonomia. Entretanto em suas conclusões, menciona que o API 50 CHL deve ser complementado com estudos genéticos moleculares, para se obter uma efetiva identificação dos *Lactobacillus*.

Sakata *et al.* (2002), em sua revisão bibliográfica mencionam que o perfil de fermentação de carboidratos é uma importante característica para a distinção de culturas de *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis*. A produção de ácido à partir dos açúcares L-arabinose e melezitose foram propostos como critério para definir estas culturas (Lauer e Kandler 1983; Scardovi 1986). No entanto, nos seus estudos, este perfil não pode distinguir *B. infantis* de *B. longum/B. suis* devido as culturas mostrarem padrões de fermentação da melezitose variados. Em estudos prévios, culturas que mostraram perfil de fermentação diferente daquele obtido para as culturas tipo, também foram reportados por Bahaka *et al.* (1993) e Yaeshima *et al.* (1992). Apesar de o tempo de isolamento não necessariamente resultar em mudanças no padrão de fermentação dos carboidratos, esse pode ser considerado um fator que dificulta a identificação. Neste sentido, os pesquisadores enfatizam que os métodos moleculares são necessários para as identificações. Conforme apresentado na literatura, os Kits de fermentação de carboidratos são úteis e devem ser utilizados nos estudos iniciais para uma preliminar caracterização, no entanto, em decorrência deles envolverem a expressão de um gene na cultura microbiana, mudanças no comportamento bacteriano em

decorrência de fatores intrínsecos e extrínsecos podem provocar alteração da expressão destes genes, o que causam alteração dos perfis de fermentação destes carboidratos e os resultados podem se comportar diferentemente para uma mesma cultura, além de que, há de se prever que culturas genotipicamente muito similares podem apresentar perfis idênticos e fornecer resultados de identificações falsos. Neste sentido os estudos moleculares apresentam-se como uma ferramenta poderosa na identificação destes microrganismos.

5.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DAS CULTURAS

O agrupamento (*clustering*) das culturas analisadas pelo estudo da fermentação dos carboidratos pelo Kit API 50 CHL, está apresentada no dendograma da Figura 1. Este dendograma foi construído à partir da análise de similaridade baseada na Distância Euclidiana e no método de *Complete Linkage* (UPGMA).

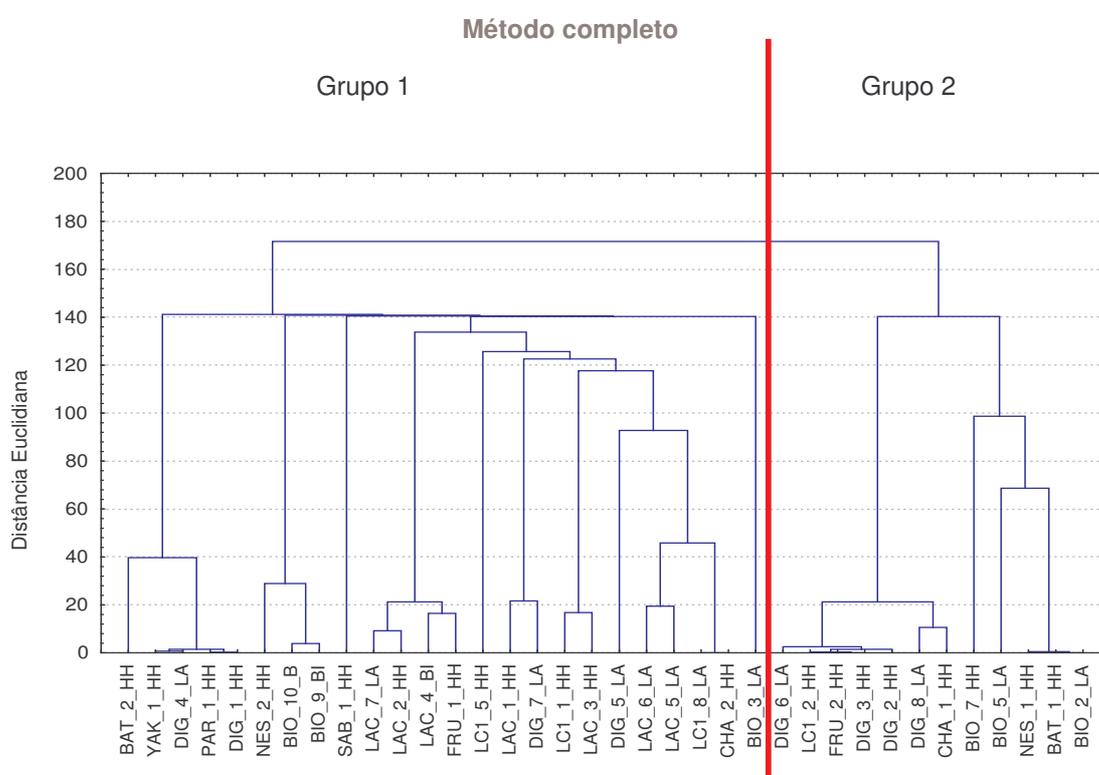


Figura 1. Dendograma da Análise Cluster pelo método de Distância Euclidiana baseado nos resultados fornecidos pelo API 50 CHL

Neste dendograma observam-se dois maiores grupos designados por 1 e 2. Esses grupos foram definidos na distância euclidiana de 140. O Grupo 1 contém 24 culturas e o Grupo 2 contém 12 culturas, sendo que o primeiro agrupou as culturas de *L. para paracasei*, *L. fructivorans*, *L. delb. bulgaricus* e *lactis*, *L. rhamnosus*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis lactis*, *L. acidophilus*, *L. curvatus* e *L. buchineri* e o segundo agrupou todas as culturas de *Leuconostoc mesenteroides cremoris* e *Streptococcus salivaricus thermophilus*. Tanto espécies heterofermentativas facultativas como homofermentativas obrigatórias foram agrupadas no primeiro cluster.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS PELO RIBOPRINTER

Foram analisadas 41 culturas, incluindo 36 isoladas de produtos e 5 culturas padrão. Dessas, a ribotipagem identificou 23 perfis distintos e 2 amostras não foram tipáveis pela técnica de ribotipagem automatizada.

5.5.1 RIBOGRUPOS

No Quadro 3.1 encontram-se listados os ribogrupos encontrados e os perfis das culturas podem ser vistos na Figura 3.1.

Duas culturas o equipamento não conseguiu tipar e as demais foram agrupadas em 8 ribogrupos que se seguem:

- **Ribogrupo S1** – 8 culturas, 6 identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e 2 não identificadas.
- **Ribogrupo S2** – 3 culturas, uma identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e 2 não identificadas, uma delas a cultura padrão KCTC 3138/ATCC 332 (*Lactobacillus johnsonii*).
- **Ribogrupo S3** – 10 culturas, 8 identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* (incluindo a cultura padrão KCTC 3237/ATCC 7469 *Lactobacillus casei*) e 2 como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- **Ribogrupo S4** – 4 culturas, 3 identificadas apenas em nível de gênero, como *Lactobacillus* sp e uma identificada como *Staphylococcus warneri*.

- **Ribogrupo S5** – 2 culturas, uma identificada como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e uma como *Bifidobacterium bifidum* (cultura padrão KCTC 3440 *Bifidobacterium bifidum*).
- **Ribogrupo S6** – 2 culturas, ambas identificadas como *Enterococcus faecium*, incluindo a cultura padrão KCTC 3465/ATCC 27537 *Bifidobacterium subtile*.
- **Ribogrupo S7** – 6 culturas, 3 identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 1 como *Lactobacillus rhamnosus*, 1 como *Enterococcus hirae* e 1 não identificada.
- **Ribogrupo S8** – 4 culturas, 3 identificadas como *Streptococcus thermophilus* e 1 como *Lactobacillus rhamnosus* (cultura padrão KCTC 1121 *Lactobacillus casei* subsp. *casei*).

A maioria dos ribogrupos foi encontrada em amostras de mais de um produto analisado:

- No Ribogrupo S1 – as culturas identificadas como *L. paracasei* subsp. *paracasei* foram encontradas em 4 produtos (Batavito, Chamyto, Parmalat e Digimon). As não identificadas foram encontradas em 2 produtos (LC1 e Biofibras).
- No Ribogrupo S2 – a cultura identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi encontrada no Lactofos e a cultura não identificada foi encontrada no Digimon.
- No Ribogrupo S3 – as culturas identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* foram encontradas em 3 produtos (Sabores, LC1 e Lactofos) e as identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* em 2 (Neston e Biofibras).
- No Ribogrupo S4 – as culturas identificadas como *Lactobacillus* sp foram encontradas no Lactofos e a identificada como *Staphylococcus warneri* no Neston.
- No Ribogrupo S5 – a cultura identificada como *L. paracasei paracasei* foi encontrada no produto Digimon.
- No Ribogrupo S6 – a cultura identificada como *Enterococcus faecium* foi encontrada no produto Parmalat.
- No Ribogrupo S7 – as culturas identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* foram encontradas em 3 produtos (Sabores, Chamyto e

Biofibras). A identificada como *Lactobacillus rhamnosus* em 1 (Fruty) e as outras duas, *Enterococcus hirae* e não identificada em 1 (Digimon).

□ No Ribogrupo S8 – as 3 culturas identificadas como *Streptococcus thermophilus* foram encontradas em 2 produtos (Fruty e Biofibras).

Várias culturas isoladas de um mesmo produto ou de produtos diferentes apresentaram perfis similares na ribotipagem, sendo agrupadas em um mesmo ribogrupo com a mesma identificação:

- Batavito 1-2 = *L. paracasei* subsp. *paracasei* Ribogrupo S1
- Digimon 1-4 = *L. paracasei* subsp. *paracasei* Ribogrupo S1
- LC1-2-5-8 = *L. rhamnosus* Ribogrupo S3
- Lactofos-2-4-7 = *L. rhamnosus* Ribogrupo S3
- Lactofos-3-5-6 = *Lactobacillus* sp Ribogrupo S4
- Biofibras-2-7 = *S. thermophilus* Ribogrupo 12 (138 S8).

Quadro 3.1. Agrupamento das culturas em ribogrupos pelo sistema de ribotipagem automatizada Riboprinter,

Ribogrupo	Resultado da identificação	Culturas		Similaridade
		Código no Riboprinter	Código da cultura	
S1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	D-1	Batavito-1	0,92
		D-2	Batavito-2	0,93
		E-1	Chamyto-1	0,92
		F-1	Parmalat-1	0,93
		G-1	Digimon-1	0,93
		G-4	Digimon-4	0,96
	Não identificado	I-1	LC1-1	-
	K-5	Biofibras-5	-	
S2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	J-1	Lactofos-1	0,92
	Não identificado	G-2	Digimon-2	0,63
	Não identificado	3138	KCTC	-
S3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	C-2	Sabores-2	0,96
		I-2	LC1-2	0,94
		I-5	LC1-5	0,91
		I-8	LC1-8	0,93
		J-2	Lactofos-2	0,96
		J-4	Lactofos-4	0,94
		J-7	Lactofos-7	0,92
		3237	KCTC	0,85
		<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	B-1	Neston-1
		K-9	Biofibras-9	0,86

Continuação Quadro 3.1

Ribogrupo	Resultado da identificação	Culturas		Similaridade
		Código no Riborinter	Código da cultura	
S4	<i>Lactobacillus</i> sp	J-3	Lactofos-3	0,99
		J-5	Lactofos-5	0,89
		J-6	Lactofos-6	0,89
	<i>Staphylococcus warneri</i>	B-2	Neston-2	0,94
S5	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	G-5	Digimon-5	0,91
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3440	KCTC	0,98
S6	<i>Enterococcus faecium</i>	F-2	Parmalat-2	0,96
		3465	KCTC	0,97
S7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	C-1	Sabores-1	0,93
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	E-2	Chamyto-2	0,94
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	K-10	Biofibras-10	0,95
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	A-1	Fruty-1	0,77
	<i>Enterococcus hirae</i>	G-7	Digimon-7	0,92
	Não identificado	G-6	Digimon-6	-
S8	<i>Streptococcus thermophilus</i>	A-2	Fruty-2	0,93
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	K-2	Biofibras-2	0,92
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	K-7	Biofibras-7	0,87
S8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1121	KCTC	0,93
-	Não tipado	G-3	Digimon-3	-
-	Não tipado	G-8	Digimon-8	-

5.5.2 COMPARAÇÃO ENTRE A IDENTIFICAÇÃO PELO KIT API 50CHL E O RIBOPRINTER

No Quadro 3.2. encontram-se os resultados da identificação de cada cultura usando o API 50CHL e o Riboprinter.

Streptococcus thermophilus – 5 culturas foram identificadas pelo API 50CHL como *S. thermophilus* (código Riboprinter A2, K2, K7, D1 e B1), com qualidade da identificação considerada boa. Dessas, 3 foram confirmadas pelo Riboprinter (A2, K2, K7) e 2 não confirmadas (D1 e B1), identificadas como *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* – 6 culturas foram identificadas pelo API 50CHL como *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (código Riboprinter E1, I2, G2, G3, G6 e G8), com qualidade da identificação variando de muito boa a duvidosa ou baixa discriminação. Duas não foram confirmadas pelo Riboprinter, sendo 1 identificada como *L. paracasei* subsp. *paracasei* (E1) e 1 como *L.*

rhamnosus (I2). Duas foram tipadas pelo riboprinter mas não identificadas pelo sistema (G2 e G6) e 2 não se mostraram típicas (G3 e G8).

Leuconostoc e *Lactococcus lactis* – 1 cultura foi identificada pelo API 50CHL como *Leuconostoc lactis* (código Riboprinter I5) e 2 como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (J1 e G7), com qualidade da identificação variando de aceitável a baixa discriminação. Uma foi confirmada pelo Riboprinter (J1) e 2 não, sendo identificadas como *L. rhamnosus* (I5) e *Enterococcus hirae* (G7).

Lactobacillus delbrueckii – 1 cultura foi identificada pelo API 50CHL como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (código Riboprinter C1) e 2 como *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (J5 e J6), com qualidade da identificação considerada muito boa (C1), aceitável apenas em nível de gênero (J5) ou de baixa discriminação (J6). Uma não foi confirmada pelo Riboprinter, sendo identificada como *L. paracasei* subsp. *paracasei* (C1) e 2 foram identificadas apenas em nível de gênero, como *Lactobacillus* (J5 e J6).

Lactobacillus acidophilus – 4 culturas foram identificadas pelo API 50CHL como *L. acidophilus*, 2 com qualidade da identificação boa ou aceitável apenas em nível de gênero (código Riboprinter KCTC 3138 e I1) e 2 com perfis considerados inválidos ou inaceitáveis (J3 e I-8). Uma não foi confirmada pelo Riboprinter, sendo identificada como *L. rhamnosus* (I8), 1 foi identificada apenas em nível de gênero, como *Lactobacillus* (J3) e 2 foram tipadas pelo riboprinter mas não identificadas pelo sistema (KCTC 3138 e I1).

Lactobacillus rhamnosus – 6 culturas foram identificadas pelo API 50CHL como *L. rhamnosus* (código Riboprinter KCTC 1121, J7, J4, J2, A1 e KCTC 3237), com qualidade da identificação variando de muito boa (KCTC 1121 e J7) ou muito boa apenas em nível de gênero (J4, J2, A1 e KCTC 3237). Todas foram confirmadas pelo Riboprinter como *L. rhamnosus*.

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* – 7 culturas foram identificadas pelo API 50CHL como *L. paracasei* subsp. *paracasei* (código Riboprinter D2, E2, F1, G1, G4, K9 e K10), com qualidade da identificação variando de muito boa a inaceitável. Todas foram confirmadas pelo Riboprinter como *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

Quadro 3.2. Comparação entre a identificação pelo API 50CHL e o riboprinter

Cultura	Identificação API 50CH	% de probabilidade e qualidade da identificação	Identificação Riboprinter e % similaridade
A-2 Fruty-2	<i>S. thermophilus</i>	98,2 bom	<i>S. thermophilus</i> 0,93
K-2 Biofibras-2	<i>S. thermophilus</i>	98,7 bom	<i>S. thermophilus</i> 0,92
K-7 Biofibras-7	<i>S. thermophilus</i>	98,7 bom	<i>S. thermophilus</i> 0,87
D-1 Batavito-1	<i>S. thermophilus</i>	98,7 bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,92
B-1 Neston-1	<i>S. thermophilus</i>	98,2 bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,86
E-1 Chamyto-1	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	89,0 baixa discriminação	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,92
I-2 LC1-2	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	98,6 bom	<i>L. rhamnosus</i> 0,94
G-2 Digimon-2	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	97,1 bom	Nenhum (<i>L.helveticus</i> 0,63) -
G-6 Digimon-6	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	99,7 muito bom	Nenhum -
G-3 Digimon-3	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	98,2 bom	Nenhum -
G-8 Digimon-8	<i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i>	78,4 duvidoso	Nenhum -
J-1 Lactofos-1	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	87,8 aceitável	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> 0,92
G-7 Digimon-7	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	60,1 baixa discriminação	<i>Enterococcus hirae</i> 0,92
I-5 LC1-5	<i>Leuconostoc lactis</i>	89,9 aceitável	<i>L. rhamnosus</i> 0,91
C-1 Sabores-1	<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	99,4 muito bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,93
J-5 Lactofos-5	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	45,8 aceitável gênero	<i>Lactobacillus</i> sp 0,89
J-6 Lactofos-6	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	26,3 baixa discriminação	<i>Lactobacillus</i> sp 0,89
3138 KCTC	<i>L. acidophilus</i>	86,6 bom gênero	Nenhum -
I-1 LC1-1	<i>L. acidophilus</i>	85,6 aceitável gênero	Nenhum -
J-3 Lactofos-3	<i>L. acidophilus</i>	68,8 inválido	<i>Lactobacillus</i> sp 0,99
I-8 LC1-8	<i>L. acidophilus</i>	ND inaceitável	<i>L. rhamnosus</i> 0,93
J-7 Lactofos-7	<i>L. rhamnosus</i>	99,1 muito bom	<i>L. rhamnosus</i> 0,92
J-4 Lactofos-4	<i>L. rhamnosus</i>	77,8 muito bom gênero	<i>L. rhamnosus</i> 0,94
J-2 Lactofos-2	<i>L. rhamnosus</i>	89,9 muito bom gênero	<i>L. rhamnosus</i> 0,96
A-1 Fruty-1	<i>L. rhamnosus</i>	85,1 muito bom gênero	(<i>L. rhamnosus</i>) 0,77
1121 KCTC	<i>L. rhamnosus</i>	99,8 muito bom	<i>L. rhamnosus</i> 0,93
3237 KCTC	<i>L. rhamnosus</i>	94,2 muito bom gênero	(<i>L. rhamnosus</i>) 0,85
G-1 Digimon-1	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99,6 muito bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,93
F-1 Parmalat-1	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99,9 bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,93
K-9 Biofibras-9	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	95,9 bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,86
K-10 Biofibras-10	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	99,8 bom	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,95
G-4 Digimon-4	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	92,6 aceitável	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,96
D-2 Batavito-2	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	60,2 bom gênero	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,93
E-2 Chamyto-2	<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i>	ND inaceitável	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,94
G-5 Digimon-5	<i>L. curvatus</i>	80,7 bom gênero	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 0,91
B-2 Neston-2	<i>L. fructivorans</i>	70,9 Muito bom gênero	<i>Staphylococcus warneri</i> 0,94
3465 KCTC	-(Coleção <i>B.subtile</i>)	ND	<i>Enterococcus faecium</i> 0,97
3440 KCTC	-(Coleção <i>B. bifidum</i>)	ND	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 0,98
C-2 Sabores-2	ND	ND	<i>L. rhamnosus</i> 0,96
F-2 Parmalat-2	ND	ND	<i>Enterococcus faecium</i> 0,96
K-5 Biofibras-5	<i>-S. saliv. thermophilus</i>	50,2 baixa discriminação	Nenhum -

Assim, no geral temos que, das 41 culturas submetidas à ribotipagem:

2 (4,9%) não se mostraram tipáveis pelo Riboprinter, ambas identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* pelo API 50CHL.

5 (12,2%) foram tipadas mas não identificadas pelo Riboprinter, 2 identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e 2 como *Lactobacillus acidophilus* pelo API 50CHL (1 não foi submetida à identificação pelo API 50CHL).

3 (7,3%) foram identificadas apenas até o nível de gênero pelo Riboprinter, 2 identificadas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 1 como *Lactobacillus acidophilus* pelo API 50CH.

31 (75,6%) foram completamente identificadas pelo Riboprinter, até o nível de espécie. Dessas, 4 não foram submetidas à identificação pelo API 50CHL, restando 27 identificadas pelos 2 métodos. Dessas 27, os métodos concordaram na identificação de 17 (63%) e discordaram na identificação de 10 (37%). As culturas com resultados discordantes concentraram-se naquelas identificadas pelo API 50CHL como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. (*cremoris* ou *lactis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As culturas com resultados concordantes concentraram-se naquelas identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Esses resultados mostraram que a ribotipagem automatizada ainda deve ser melhor estudada, principalmente na análise de culturas de *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Sample/ Label/ DuPont ID Label/ RiboGroup/ Sim to Sel	RiboPrint (R) Pattern
222-138-5 D1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-136-S-1 0.04	
222-136-1 E1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-136-S-1 0.05	
222-136-2 J1 Lactococcus lactis ss. lactis RIB01 222-136-S-2 0.06	
222-139-2 C2 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.14	
222-138-2 I2 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.12	
222-138-3 I5 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.14	
222-138-4 I8 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.11	
222-136-3 J2 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.15	
222-136-5 J4 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.12	
222-136-8 J7 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-136-S-3 0.17	
222-136-4 J3 Lactobacillus species RIB01 222-136-S-4 0.26	
222-136-6 J5 Lactobacillus species RIB01 222-136-S-4 0.26	
222-136-7 J6 Lactobacillus species RIB01 222-136-S-4 0.23	
222-138-6 D2 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-137-S-1 0.06	
222-139-5 F1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-137-S-1 0.04	
222-137-1 G1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-137-S-1 0.15	
222-137-4 G4 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-137-S-1 0.05	
222-137-2 G2 {Lactobacillus helveticus} RIB01 222-137-S-2 0.24	
222-137-5 G5 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-137-S-5 0.12	
222-137-7 G7 Enterococcus hirae RIB01 222-137-S-7 0.08	
222-139-1 C1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-138-S-7 0.04	
222-138-7 F9 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-138-S-7 0.05	
222-138-7 E2 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-138-S-7 0.05	
222-140-4 K10 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-138-S-7 0.04	
222-138-8 K2 Streptococcus thermophilus RIB01 222-138-S-8 0.10	
222-140-2 K7 Streptococcus thermophilus RIB01 222-138-S-8 0.10	
222-139-3 B1 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-139-S-3 0.06	
222-139-4 B2 Staphylococcus warneri RIB01 222-139-S-4 0.22	
222-139-6 F2 Enterococcus faecium RIB01 222-139-S-6 0.20	
222-140-6 KCIC 3465 Enterococcus faecium RIB01 222-139-S-6 0.20	
222-139-7 A1 {Lactobacillus rhamnosus} RIB01 222-139-S-7 0.09	
222-139-8 A2 Streptococcus thermophilus RIB01 222-139-S-8 0.09	
222-140-3 K9 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-140-S-3 0.07	
222-140-5 KCIC 3440 Bifidobacterium bifidum RIB01 222-140-S-5 0.02	
222-140-8 KCIC 1121 Lactobacillus rhamnosus RIB01 222-140-S-8 0.17	
222-141-1 KCIC 3236 Staphylococcus capitis RIB01 222-141-S-1 0.23	
222-141-4 KCIC 3510 Lactobacillus paracasei ss. paracasei RIB01 222-141-S-4 0.10	
222-141-5 KCIC 3111 Lactobacillus acidophilus RIB01 222-141-S-5 0.18	
222-141-7 G6 <None> RIB01 222-141-S-7 0.36	
222-138-1 I1 <None> RIB01 222-138-S-1 0.02	
222-140-1 K5 <None> RIB01 222-140-S-1 0.07	
222-141-2 KCIC 3138 <None> RIB01 222-141-S-2 1.00	
222-141-3 KCIC 3237 <None> RIB01 222-141-S-3 0.15	

FIGURA 3.1. PERFIS DO RIBOPRINTER

5.6 TESTE DE RESISTÊNCIA AO pH

Foram analisadas 36 culturas quanto à resistência ao pH, cujos resultados encontram-se na Tabela 4.1. A maioria das culturas apresentou completa perda da viabilidade após 1 a 3 hora em pH 1,0 ou 2,0. Em pH 3,0 a taxa de sobrevivência foi maior. Os gráficos 1, 2 e 3 mostram a evolução da perda da viabilidade das culturas nos pHs estudados.

Em pH 1, 25 (69%) das culturas perderam completamente a viabilidade após os tempos de exposição, somente 6 (17%) apresentaram crescimento após exposição de 1 hora e 5 (14%) tiveram condições mínimas de crescimento após os três tempos de exposição.

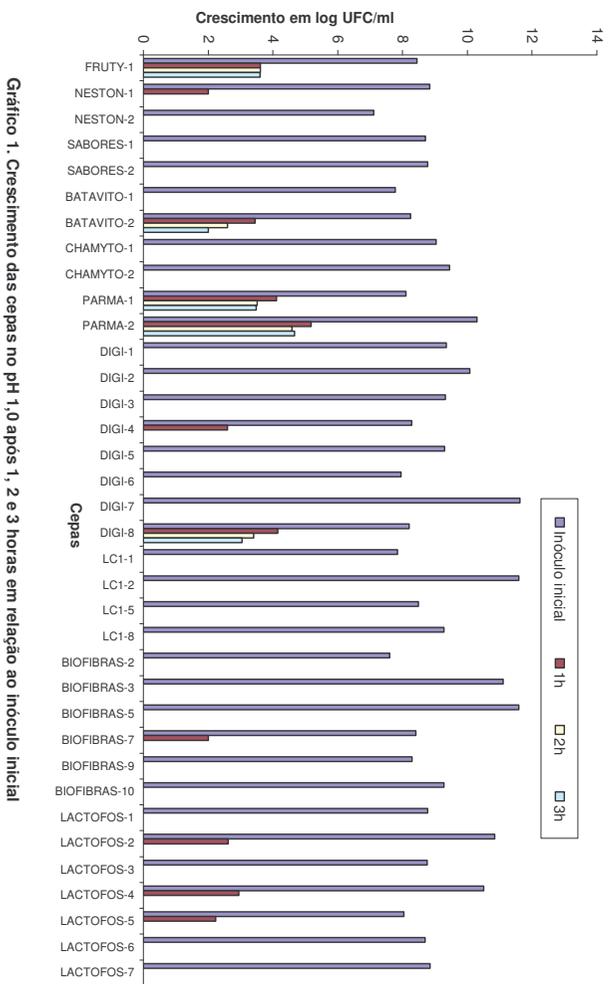
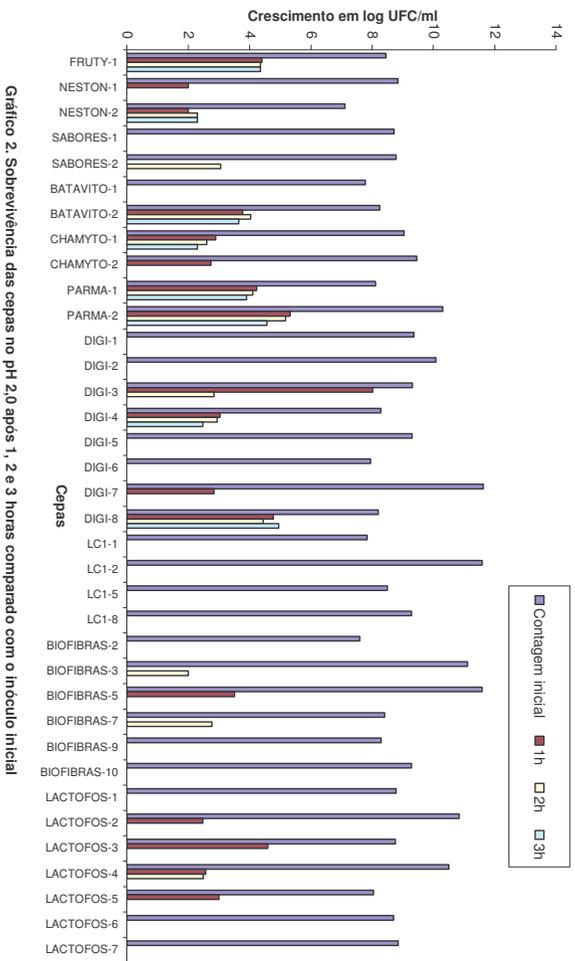
Em pH 2, 16 (44%) das culturas perderam completamente a viabilidade após os tempos de exposição, somente 7 (19%) apresentaram crescimento após exposição de 1 hora e 10 (28%) tiveram condições mínimas de crescimento após os três tempos de exposição.

Em pH 3, todas as culturas tiveram crescimento no entanto, na interpretação dos resultados em comparação aos obtidos por outros pesquisadores obtivemos que apesar do crescimento, nenhuma cultura deste estudo apresentou as condições ideais para serem classificadas como probióticas, como relatado por Goldin *et al.* (1992) que avaliou a resistência de *Lactobacillus* GG ao pH em suco gástrico após 4 horas em pH 3, a qual não apresentou perda de viabilidade, concluindo que essa cultura pode sobreviver à passagem pelo estômago, particularmente se for ingerida com produtos lácteos, que podem elevar o pH do estômago até 3 ou mais. Em outro estudo realizado por Prasad *et al.* (1998), que avaliou várias culturas de lactobacilos e bifidobactérias, foram consideradas como potencialmente probióticas as culturas que apresentam 80% de sobrevivência (menos de 0,1 reduções) após 3 horas de permanência em pH 3 ou 1% de bile, o que não ocorreu com nenhuma cultura estudada. Na avaliação de Bernardeau *et al.* (2001), que testou a resistência de culturas de *L.acidophilus* e *L.rhamnosus* em pH 3 por 90 minutos e na presença de 0,1% de bile (24h), não foi observada redução na contagem de viáveis. Segundo o autor esse é o tempo de permanência no estômago, “in vivo”, levando à conclusão que as culturas são

potencialmente probióticas, podendo resistir à passagem pelo estômago. As culturas foram isoladas nas fezes nos estudos “in vivo” realizados. De acordo com Bernardeau *et al.* (2001), apenas 2 culturas se mostraram potencialmente probióticas, a cultura de *Lactobacillus rhamnosus* isolada do iogurte Fruty (Fruty-1) e a cultura de *Lactobacillus acidophilus* isolada da mistura probiótica Lactofós (Lactofos-7).

Tabela 4.1. Resultados do teste de resistência ao pH das culturas isoladas

Culturas isoladas	Inicial	Contagem (Log UFC/ml)								
		pH 3,0			pH 2,0			pH 1,0		
		1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
Fruty-1	8,45	8,53	7,23	6,89	4,40	4,36	4,36	3,62	3,62	3,60
Neston-1	8,84	2,00	<2	<2	2,00	<2	<2	7,30	7,15	6,72
Neston-2	7,11	7,17	6,95	6,41	2,00	2,30	2,30	<2	<2	<2
Sabores-1	8,71	7,20	4,78	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Sabores-2	8,78	7,11	7,04	6,58	<2	3,06	<2	<2	<2	<2
Batavito-1	7,78	3,60	2,84	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Batavito-2	8,25	4,50	4,41	3,76	3,78	4,04	3,65	3,45	2,60	2,00
Chamyto-1	9,04	7,20	6,78	6,90	2,90	2,60	2,30	<2	<2	<2
Chamyto-2	9,45	7,52	3,30	4,43	2,74	<2	<2	<2	<2	<2
Parmalat-1	8,11	5,57	4,58	4,56	4,23	4,11	3,90	4,11	3,52	3,48
Parmalat-2	10,30	5,50	5,46	5,23	5,32	5,18	4,57	5,18	4,59	4,67
Digimon-1	9,36	6,23	4,45	3,08	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Digimon-2	10,08	5,76	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Digimon-3	9,32	8,84	4,15	4,23	8,02	2,84	<2	<2	<2	<2
Digimon-4	8,28	7,15	6,00	5,49	3,04	2,95	2,48	2,60	<2	<2
Digimon-5	9,30	7,84	4,72	3,50	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Digimon-6	7,95	5,34	2,30	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Digimon-7	11,62	7	5,52	5,30	2,84	<2	<2	<2	<2	<2
Digimon-8	8,20	6,38	6,34	6,32	4,78	4,45	4,95	4,15	3,41	3,04
LC1-1	7,84	7,41	3,70	2,00	<2	<2	<2	<2	<2	<2
LC1-2	11,59	8,04	7,49	7,03	<2	<2	<2	<2	<2	<2
LC1-5	8,49	7,20	7,15	6,57	<2	<2	<2	<2	<2	<2
LC1-8	9,28	6,70	5,45	4,78	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Biofibras-2	7,60	3,15	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Biofibras-3	11,11	8,80	3,48	<2	<2	2,00	<2	<2	<2	<2
Biofibras-5	11,59	8,23	4,20	2,60	3,51	<2	<2	<2	<2	<2
Biofibras-7	8,41	5,00	5,34	5,58	<2	2,78	<2	2,00	<2	<2
Biofibras-9	8,29	5,84	4,65	3,95	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Biofibras-10	9,28	8,04	5,7	5,78	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Lactofos-1	8,78	7,23	6,84	6,98	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Lactofos-2	10,84	7,39	3,07	3,58	2,48	<2	<2	2,62	<2	<2
Lactofos-3	8,76	9,38	8,00	7,50	4,60	<2	<2	<2	<2	<2
Lactofos-4	10,50	3,5	3,16	2,48	2,57	2,49	<2	2,95	<2	<2
Lactofos-5	8,04	5,53	5,23	5,23	3,00	<2	<2	2,23	<2	<2
Lactofos-6	8,70	7,46	6,11	5,08	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Lactofos-7	8,85	9,08	8,54	3,70	<2	<2	<2	<2	<2	<2



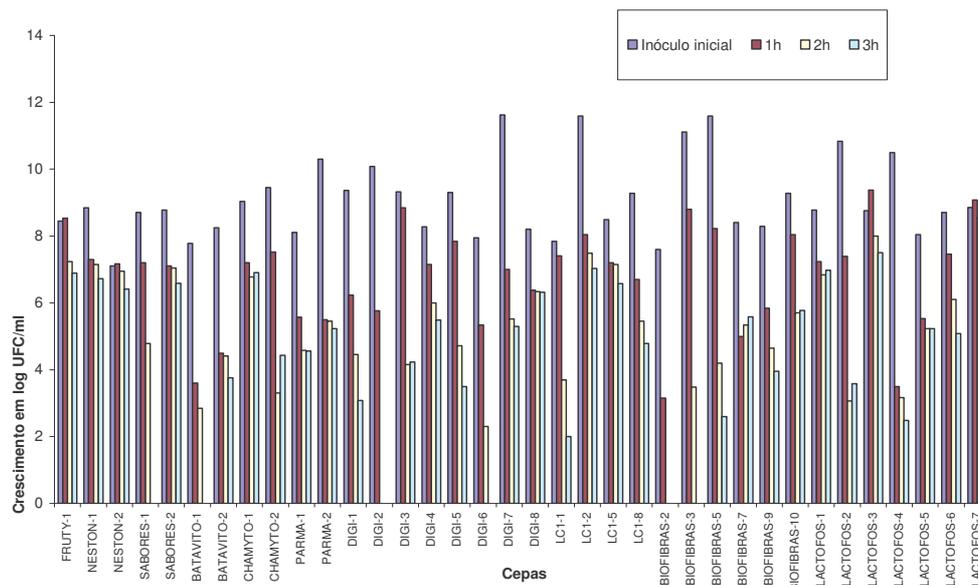


Gráfico 3. Crescimento das cepas no pH 3 em diferentes tempos de exposição comparado com o inóculo inicial

De acordo com os experimentos de Goderska *et al.* (2002), o *L. rhamnosus* apresenta uma sobrevivência de 10^6 a pH 2 e 3 por 0,5 horas de exposição. A taxa de sobrevivência é ausente após uma hora (pH 2) e nove horas (pH 3), sendo que em pH 4-6 as culturas sobreviveram por até 30 dias.

A sobrevivência do *Lactobacillus* GG e do *Lactobacillus bulgaricus* ao suco gástrico em várias condições de pH foram analisados e os resultados de perda da viabilidade ao suco gástrico após 4 horas a um pH de 3,0-7,0 foram menores quando comparados a um pH 1,0 para o *Lactobacillus* GG. Em contraste, o *L. bulgaricus* obteve um declínio das contagens de viáveis particularmente pronunciados ao pH 3,0, onde a perda foi notada a 30 minutos e após 4 horas de exposição 5 log de redução foram observados. Em pH 3,0 por 1 hora de exposição a cultura identificada como *L. rhamnosus* (Lactofós-4), foi a única a apresentar 7 log de redução, sendo que a este valor de pH as culturas *S. salivarius. thermophilus* (Batavito-1, Biofibras-2 e 5), *L. para paracasei* (Batavito-2, Digimon-1, Chamyto-2 e Biofibras-9), *Leuconostoc. mesenteroides. cremoris* (Digimon-2, 3 e 6, LC1-2), *L. curvatus* (Digimon-5), *Lactococcus. lactis lactis* (Digimon-7), *L. acidophilus* (LC1-1 e 8), *L. buchineri* (Biofibras-3), *L. rhamnosus* (Lactofós-2 e 7), *L. delbrueckii. lactis* (Lactofós-6) e *L. delbrueckii. bulgaricus* (Sabores-1) as

reduções ficaram acima de 3,0 e chegaram a até >9,11 log. Em pH 2,0 e 1,0 as reduções decimais atingiram valores em log acima de 4 para a maioria das culturas.

Hood e Zottola (1988), tem reportado que o *L. acidophilus*, apresentou declínio da contagem a pH 2, mas a pH 4 a contagem de células viáveis não decresceu significativamente. Estes resultados foram confirmados por Lankaputhra e Shah (1995), estudando a sobrevivência de nove culturas de *Bifidobacterium* spp. em condições ácidas (pH 1,5-3,0) encontraram que *B. longum* e *B. pseudolongum* apresentaram elevada sobrevivência. Neste estudo as culturas *B. adolescentis* e *B. breve*, sobreviveram pobremente a todos os níveis de pH testados (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0). As seis culturas de *L. acidophilus* estudadas sobreviveram ao pH 3 ou acima com contagem de viáveis de $>10^7$ UFC/g após 3 horas de incubação. Todos os resultados obtidos no estudo de viabilidade das culturas foram dependentes do pH, do tempo de exposição ao ácido e das espécies e culturas usadas. Playne (1993), tem reportado no entanto que o *L. acidophilus* não cresce bem a pH abaixo de 4. Rius *et al.* (1994), concluíram que o *L. acidophilus* possui citoplasma com alta capacidade tamponante (pH 3,72-7,74), o qual favorece sua resistência a mudanças do pH e ganho da estabilidade em condições ácidas. O *L. acidophilus* é mais tolerante a condições ácidas do que *B. bifidum* e o seu crescimento é significativamente retardado abaixo de pH 5 (Costello 1993). No entanto, a tolerância de *Bifidobacterium* a condições ácidas do estômago tem sido cultura específica (Berrada *et al.* 1991). Clark *et al.* (1993) tem reportado que *B. longum* mostra melhor sobrevivência em condições ácidas quando comparado com *B. infantis*, *B. adolescentis* e *B. bifidum*.

Chou e Weimer (1999), trabalhando com culturas de *Lactobacillus acidophilus* ao tratamento ácido a pH 3,5 por 90 minutos, obtiveram resultados de tolerância a 37°C para todas as culturas testadas. A cultura ATCC 11975 apresentava crescimento lento a esta condição, mas não produzia colônias no meio MRS acidificado após um período de 96 horas, sugerindo que esta cultura possuía a habilidade de sobreviver por períodos curtos na presença de ácido, mas não em períodos longos de exposição ao mesmo.

Avaliando culturas *L. acidophilus* para uso como probióticos, Chaves *et al.* (1997) encontraram taxas de sobrevivência média de 0,53% em meio com ácido clorídrico (pH 2,0), após uma hora de exposição. Em pH 3,0 observaram 55,6, 26,1 e 11,7% de sobreviventes após 1, 2 e 3 horas de exposição, respectivamente.

Em outro estudo *in vitro*, a viabilidade de espécies de *Bifidobacterium* a pH 3 por 180 minutos não foi modificada, sendo que decresceu lentamente a pH 2, e foi zero após 60 minutos a pH 1 (Pochart *et al.* 1992).

O efeito do ácido na viabilidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram destacados por Pereira *et al.* (2002), que obtiveram para o *Lactobacillus* e *S. thermophilus*, os menores índices de sobrevivência em relação a outras culturas testadas. A sobrevivência foi decrescida a 15 minutos ao pH 2, sendo a contagem total em UFC para o *L. casei* Shirota, *L. brevis*, *B. infantis* e *S. bovis* significativamente diminuíram após 15 minutos em pH 2, chegando de 1,7 para 4,5 ciclos logarítmicos. A viabilidade do *L. casei* e *L. crispatus* em pH 2, reduziram 1 ciclo logarítmico após 30 minutos, e após 60 minutos estas culturas mostraram diminuição das contagens de 3 para 4 ciclos. O *L. fermentum*, *delbrueckii* e *acidophilus johnsonii* foram as culturas classificadas como as mais tolerantes com 100% viabilidade a pH 2 por 2 horas.

Berrada *et al.* (1991), demonstraram que de duas estirpes comerciais de *Bifidobacterium*, somente uma delas apresentou resistência ao pH 3,0, mantendo os níveis iniciais de 10^7 UFC/ml após 90 minutos de incubação. Essas estirpes foram também avaliadas em humanos, verificando-se que a estirpe ácido-resistente sobreviveu melhor do que a não resistente. Portanto, a seleção de estirpes ácido-resistentes é um dos importantes pontos a serem avaliados para culturas probióticas pois estas devem atravessar o estômago antes de atingirem o intestino, seu habitat natural. Kolars *et al.* (1984) e Savaiano *et al.* (1984) reportaram que o *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* são resistentes a acidez gástrica e conseqüentemente são ativos no intestino. Esta resistência por sua vez, não tem sido demonstrado para bifidobacterias segundo Rasic e Kurmann (1983).

Dunne *et al.* (2001) comparando diferentes culturas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de diferentes fontes a pH de 1,2 e 2,5, obtiveram variações nas contagens após os diferentes tempos de exposição (0, 5, 30 e 60 minutos), sendo que as culturas de *Bifidobacterium* sp apresentaram menor resistência do que as de *Lactobacillus*, após 5 minutos (pH 1,2) e 30 minutos (pH 2,5), a contagem de viáveis foi ausente.

Lui *et al.* (1999), relataram que após 3 horas de incubação a um pH 3,0 o número de células viáveis foram levemente reduzidas. No entanto, a taxa de sobrevivência da cultura utilizada como controle (LC1 – Nestlé), foi maior quando comparada com as outras culturas testadas.

Em estudo com *Bifidobacterium* spp., Hansen *et al.* (1999), mencionam que a sobrevivência de bifidobactérias no suco gástrico, o qual possui taxa de pH entre 1,5-2,5, tem variado significativamente entre espécies e culturas de mesma espécie. Em seus resultados, no pH 1,0, a contagem inicial de $10^6 - 10^7$ UFC/ml de todas as culturas analisadas foi rapidamente decrescida a menos que 10 UFC/ml após 30 minutos. A habilidade de sobrevivência a pH 2,0 variou grandemente. Após 2 horas a pH 2,0, a população da cultura mais resistente, *B. lactis* Bb- 12, constituiu 5,3% da população correspondente encontrada na amostra controle a pH 6,0. Populações de *B. adolescentis* e *B. breve* foram reduzidas a 3-4 Log₁₀ (UFC/ml) enquanto todas as outras culturas exibiram baixa tolerância a pH 2,0. De acordo com os autores, a exposição ao suco gástrico a pH 3,0 foi a menos prejudicial para as culturas estudadas, assim, concluíram que as culturas *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis* e *B. longum*, após 2 horas, as taxas relativas de sobrevivência da maioria delas foi de 10% de seus respectivos controles a pH 6,0, indicando alto grau de tolerância para esses valores de pH. A concentração de bile utilizada também interferiu na sobrevivência das culturas, assim, 1,0% de bile foi mais inibitória do que 0,5%.

Os resultados dos testes de pH para as culturas padrão estão apresentados na Tabela 4.2 a seguir:

Tabela 4.2. Resultados do teste de resistência ao pH das culturas padrão utilizadas no trabalho.

Cultura padrão	Contagem (Log UFC/ml)									
	Inicial	pH 3,0			pH 2,0			pH 1,0		
		1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
<i>L. delbr. delbr.</i> ATCC 9649	7,70	6,30	6,30	2,30	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. delb.lactis</i> ATCC 7830	7,48	6,78	5,60	4,90	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	8,30	7,79	7,28	6,60	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. gasseri</i> ATCC 332	7,41	5,78	5,38	4,48	4,11	4,04	3,18	<2	<2	<2
<i>L. casei rhamnosus</i> ATCC 7469	8,08	7,25	6,60	6,58	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	7,08	5,90	4,60	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>B. bifidum</i> KCTC 3440	9,84	8,20	7,15	6,00	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. paracasei paracasei</i> (L. casei casei) JCM 8130	8,30	6,08	5,83	4,41	<2	<2	<2	<2	<2	<2

Os Gráficos 4, 5 e 6 apresentam a evolução da perda da viabilidade das culturas padrão nos pHs estudados e podem ser vistos no Anexo F.

Em pH 1, nenhuma cultura apresentou viabilidade após os tempos de exposição. Em pH 2, apenas 1 cultura (*L. gasseri* ATCC 332) apresentou alguma recuperação após os tempos de exposição e em pH 3, todas as culturas apresentaram uma recuperação inferior aos limites estabelecidos para serem classificadas como probióticas

5.7. TESTE DE RESISTÊNCIA À BILE

Os resultados obtidos no teste de resistência à bile encontram-se relatados nas Tabelas 4.3. e 4.4.

Tabela 4.3. Resultados dos testes de resistência à bile aplicados às culturas isoladas de produtos.

Culturas isoladas dos produtos		Contagem (Log UFC/ml)				Reduções decimais*		
Código	Identificação (API 50CH)	Sem bile	1%	0,6%	0,2%	1%	0,6%	0,2%
Lactofos 3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	9,18	8,43	8,53	8,41	0,75	0,65	0,77
LC1-1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7,28	3,00	3,00	3,00	4,28	4,28	4,28
LC1-8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	9,20	8,60	8,63	8,65	0,60	0,57	0,55
Fruty 1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9,32	7,51	7,76	7,80	1,81	1,56	1,52
Lactofos 2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	6,18	3,00	3,00	3,00	3,18	3,18	3,18
Lactofos 4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8,49	8,23	8,18	8,15	0,26	0,31	0,34
Lactofos 7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9,15	8,28	8,36	8,56	0,87	0,79	0,59
Batavito 2	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	10,25	8,38	9,20	9,52	1,87	1,05	0,73
Biofibras 9	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	9,45	8,18	8,36	8,52	1,27	1,09	0,93
Biofibras 10	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	8,46	8,20	8,15	8,08	0,26	0,31	0,38
Chamyto 2	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	9,43	8,68	8,76	8,78	0,75	0,67	0,65
Digimon 4	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	10,46	9,08	9,18	9,23	1,38	1,28	1,23
Parmalat 1	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	11,38	9,08	9,40	9,54	2,30	1,98	1,84
Lactofos 5	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	9,26	6,90	6,95	8,48	2,36	2,31	0,78
Lactofos 6	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	11,49	3,00	3,00	10,72	8,49	8,49	0,77
Digimon 5	<i>L.curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	9,18	8,18	9,15	9,11	1,00	0,03	0,07
Batavito 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	12,34	11,68	11,72	11,78	0,66	0,62	0,56
Biofibras 2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	9,20	8,48	8,46	8,48	0,72	0,74	0,72
Biofibras 7	<i>Streptococcus thermophilus</i>	9,57	8,57	8,78	9,28	1,00	0,79	0,29
Fruty 2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	12,26	10,75	11,15	11,41	1,51	1,11	0,85
Digimon 7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	8,51	7,90	7,95	8,23	0,61	0,56	0,28
Lactofos 1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	9,49	8,60	9,65	8,77	0,89	-0,16	0,72
Chamyto 1	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	12,34	9,61	10,44	10,57	2,73	1,90	1,77
Digimon 1	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	10,40	8,57	9,00	9,26	1,83	1,40	1,14
Digimon 3	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	9,25	8,40	8,62	8,84	0,85	0,63	0,41
Digimon 6	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	6,45	5,60	5,84	5,90	0,85	0,61	0,55
Digimon 8	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	9,54	9,15	9,18	9,15	0,39	0,36	0,39
LC1-2	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	8,52	8,08	8,28	8,26	0,44	0,24	0,26
LC1-5	<i>Leuconostoc lactis</i>	9,08	8,00	8,52	8,78	1,08	0,56	0,30

* (Log UFC/ml sem bile) – (Log UFC/ml na presença de bile)

De acordo com Prasad *et al.* (1998), culturas que apresentam taxa de 80% de sobrevivência (redução menor do que 0,1 log) na presença de 1,0% w/v de bile e pH 3,0 por 3 horas são resistentes. Em seus resultados, a maioria das culturas testadas falharam por não manter 80% de viabilidade. Segundo esse critério, nenhuma das 29 culturas isoladas dos produtos também mostraram resistência à bile, assim como nenhuma das 22 culturas padrão de coleções analisadas.

De acordo com Reis *et al.* (1998), para a seleção de lactobacilos resistentes à bile, uma cultura que apresente um crescimento em presença de 1% de Oxgall, igual ou superior a 20% daquele obtido no controle, é considerada uma cultura resistente (redução menor do que 0,7 log). Segundo este critério, 7 (24%) das 29 culturas isoladas de produtos mostraram-se resistentes: uma de *L.acidophilus* (LC1-8), uma de *L.rhamnosus* (Lactofos-4), uma de *L.paracasei* subsp. *paracasei* (Biofibras-10), uma de *Streptococcus thermophilus* (Batavito-1), uma de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Digimon-7) e duas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* (LC1-2 e Digimon-8).

Das 29 culturas testadas, 15 delas (51%) obtiveram resistência considerada boa pelos critérios de Reis *et al.* (1998), com 20% de sobrevivência no mínimo, as diferentes concentrações de sais biliares, onde o tratamento mais prejudicial a recuperação das culturas foi o que usou a bile a 1,0%, seguido pelo 0,6 e 0,2% como também apresentado por Klaenhammer e Kleeman (1981), com culturas de *Lactobacillus acidophilus*. Em suas conclusões a redução na habilidade de formação de colônias das culturas foi observada quando a concentração de bile foi aumentada de 0,6% para 1,0%.

Sanders *et al.* (1996), avaliando culturas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, concluíram que todas as culturas de lactobacilos e a maior parte das culturas de bifidobactérias foram resistentes à variadas concentrações de sais biliares (1,0 a 3,0%). O resultado apresentado sugere que a bile não foi considerada uma barreira crítica para o crescimento das culturas estudadas, como também apresentado para as culturas isoladas neste estudo.

A Tabela 4.4 mostra os resultados do teste de resistência a bile para 22 culturas padrão (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*). Segundo o critério de Reis *et al.* (1998), 5 (23%) culturas apresentaram resistência: KCTC 1121 (*L. casei* subsp. *casei*), KCTC 3105 (*L. plantarum*), KCTC 3425 (*Bifidobacterium ruminantun*), KCTC 3462 (*Bifidobacterium gallicum*) e KCTC 3480 (*Bifidobacterium cuniculi*).

Tabela 4.4. Resultados dos testes de resistência à bile aplicados à culturas padrão de coleção de culturas.

Código	Culturas padrão IDENTIFICAÇÃO NO CATÁLOGO DE CULTURAS	Contagem (Log UFC/ml)				Reduções decimais		
		Sem bile	1%	0,6%	0,2%	1%	0,6%	0,2%
KCTC 3111	<i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i>	12,25	3,00	7,57	11,73	9,25	4,68	0,52
KCTC 3138	<i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> (<i>L.ACIDOPHILUS</i>)	12,46	9,23	8,69	11,71	3,23	3,77	0,75
KCTC 3237	<i>L.CASEI</i> SUBSP. <i>RHAMNOSUS</i>	9,28	8,32	8,48	8,48	0,96	0,80	0,80
KCTC 3510	<i>L.PARACASEI</i> SUBSP. <i>PARACASEI</i>	10,08	7,30	8,41	8,60	2,78	1,67	1,48
KCTC 3109	<i>L.CASEI</i> SUBSP. <i>CASEI</i>	11,28	9,41	9,52	10,25	1,87	1,76	1,03
KCTC 1121	<i>L.CASEI</i> SUBSP. <i>CASEI</i> (<i>L.BULGARICUS</i>)	12,36	11,70	11,76	11,78	0,66	0,60	0,58
KCTC 1047	<i>L.DELBRUECKII</i> SUBSP. <i>DELBRUECKII</i>	12,15	10,32	10,45	11,49	1,83	1,70	0,66
KCTC 1058	<i>L.DELBRUECKII</i> SUBSP. <i>LACTIS</i>	12,15	9,70	10,40	10,65	2,45	1,75	1,50
KCTC 3105	<i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	12,32	11,68	11,80	11,84	0,64	0,52	0,48
KCTC 3440	<i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i>	10,04	8,56	8,86	9,20	1,48	1,18	0,84
KCTC 3216	<i>BIFIDOBACTERIUM</i> <i>ADOLESCENTIS</i>	7,18	3,00	3,00	3,00	4,18	4,18	4,18
KCTC 3230	<i>BIFIDOBACTERIUM INDICUM</i>	12,38	11,65	11,63	11,62	0,73	0,75	0,76
KCTC 3425	<i>BIFIDOBACTERIUM</i> <i>RUMINANTUN</i>	12,50	11,83	11,89	11,86	0,67	0,61	0,64
KCTC 3467	<i>BIFIDOBACTERIUM MINIMUM</i>	12,45	11,41	11,48	11,61	1,04	0,97	0,84
KCTC 3229	<i>BIFIDOBACTERIUM SUIS</i>	9,18	8,18	8,20	8,23	1,00	0,98	0,95
KCTC 3224	<i>B.PSEUDOLONGUM</i> SUBSP <i>PSEUDOLONGUM</i>	11,00	9,57	10,08	10,23	1,43	0,92	0,77
KCTC 3227	<i>BIFIDOBACTERIUM BOUM</i>	9,11	8,25	8,32	8,53	0,86	0,79	0,58
KCTC 3271	<i>BIFIDOBACTERIUM</i> <i>ASTEROIDES</i>	9,90	8,52	8,75	8,85	1,38	1,15	1,05
KCTC 3479	<i>BIFIDOBACTERIUM CHOERINUM</i>	10,18	8,11	8,91	9,28	2,07	1,27	0,90
KCTC 3465	<i>BIFIDOBACTERIUM SUBTILE</i>	12,46	11,69	11,81	11,85	0,77	0,65	0,61
KCTC 3462	<i>BIFIDOBACTERIUM GALLICUM</i>	12,43	11,80	11,86	11,86	0,63	0,57	0,57
KCTC 3480	<i>BIFIDOBACTERIUM CUNICULI</i>	12,28	11,68	11,79	11,83	0,60	0,49	0,45

* (Log UFC/ml sem bile) – (Log UFC/ml na presença de bile)

A cultura padrão KCTC 3105 (*L. plantarum*) foi a cultura mais resistente à concentração de 1,0% de bile com porcentagem de sobrevivência acima de 20%, sendo que para a concentração de 0,2% de bile a recuperação da contagem ficou acima de 30%. A concentração de 1,0% de sais biliares para as culturas *B. indicum* (KCTC 3230), *B. ruminantum* (KCTC 3425), *L. casei* subsp. *casei* (KCTC

3109), e *B. adolescentis* (KCTC 3216) foi mais prejudicial para a recuperação das culturas. As *B. bifidum* (KCTC 3440), *L. acidophilus* (KCTC 3111), *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* (KCTC 3224), *B. boum* (KCTC 3227), e *B. cuniculi* (KCTC 3480), a concentração de 0,6% de bile foi a mais prejudicial.

Jacobsen *et al.* (1999), estudando a atividade de 47 culturas de *Lactobacillus* spp. à concentração de 0,3% de sais biliares, obtiveram alta resistência com crescimento sendo retardado de 1 para mais de 4 horas para 16 culturas. O restante das culturas testadas não cresceram, mas todas as culturas com exceção de uma sobreviveu a 4 horas em 0,3% oxgall.

A relação entre origem das culturas e suas habilidades de sobrevivência em condições ácidas e altas concentrações de bile realizadas com culturas de origem humana e de leite foram relatadas por Prasad *et al.* (1998) que encontraram taxa de sobrevivência maior para culturas de origem humana em comparação com as de origem do leite. Em adição, no gênero *Lactobacillus*, foram encontradas diferenças entre culturas do grupo *rhamnosus* (as quais foram mais tolerantes ao ácido e bile) em comparação ao grupo *acidophilus*.

Alguns dados observados por pesquisadores diferem em relação à resistência de bactérias bífidas à bile. Enquanto resultados “*in vitro*”, obtidos por Ibrahim e Bezkorovainy (1993) demonstram que *B. infantis* apresenta maior resistência à bile do que *B. breve*, *B. bifidum* e *B. longum*, Clark e Martin (1994) observaram que *B. longum* foi mais resistente à bile do que *B. infantis*, *B. adolescentis* e *B. bifidum*. Verifica-se, portanto, existir uma grande variação na resistência de bifidobactéria à bile, refletindo a possibilidade dessa resistência ser estirpe específica. Logo, a seleção de culturas resistentes à bile é necessária para possibilitar melhor atuação desses microrganismos como probióticos, uma vez que esta é reconhecidamente uma das barreiras fisiológicas presentes no trato gastrointestinal.

5.8 TESTE DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

Devido à inexistência de uma cultura previamente conhecida como sensível à bacteriocina, todas as culturas foram avaliadas umas contra as outras, pelo

método de difusão em poços, para a detecção de culturas produtoras de bacteriocinas, bem como para a seleção de culturas sensíveis.

Os resultados do teste de produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de produtos e pelas culturas padrão encontram-se apresentados no Quadro 4.5.

Utilizando-se o método de difusão em poços dos extratos de bacteriocinas tratados a 95°C/10min, não se observou a formação de halos de inibição para todas as culturas isoladas. Este resultado também foi encontrado para as culturas padrão analisadas. Neste caso podemos dizer que nenhuma cultura (isoladas e padrão) promoveram a inibição da cultura utilizada como indicadora, ou seja não produziu bacteriocina, não podendo ser classificadas como probióticas.

Para a comparação dos resultados obtidos vários trabalhos científicos foram investigados. Nestes trabalhos, a frequência de culturas produtoras de bacteriocina foi baixa. Informações sobre a produção de bacteriocinas por algumas culturas de referência são disponíveis na literatura especializada. Segundo Salminen *et al.* (1998a), citado por Holzapfel *et al.*, (2001), *Lactobacillus. casei* Shirota e *Lactobacillus. acidophilus* NCFB 1748 não apresentam a característica de produção de bacteriocinas, enquanto o *Lactobacillus. johnsonii* LA 1 produz uma bacteriocina e para *Lactobacillus. rhamnosus* GG ATCC 53103 não existem ainda dados disponíveis. Messens e De Vuyst (2002) citam os trabalhos de Chin *et al.* (2001) que isolaram 150 culturas de bactérias ácido lácticas somente quatro culturas de *Lactobacillus* sp. produziram bacteriocinas e os de Larsen *et al.* (1993) que analisaram 335 bactérias lácticas isoladas de um produto ácido que somente 18 isolados apresentaram atividade antimicrobiana decorrente da presença de compostos protéicos, provavelmente bacteriocinas. Gänzle (1998), trabalhando com 65 culturas de *Lactobacillus* isolados de uma massa ácida de trigo, encontrou somente três culturas que exibiram atividade antimicrobiana.

Quadro 4.5. Resultados do teste de produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de produtos, verificando cada uma contra todas as outras.

Cultura	Formação de halo de inibição contra a cultura											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
01. Lactofos 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02. LC1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03. LC1-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04. Fruty 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05. Lactofos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06. Lactofos 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07. Lactofos 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08. Batavito 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09. Biofibras 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Biofibras 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. Chamyto 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. Digimon 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
13. Parmalat 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. Lactofos 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. Lactofos 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. Sabores 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. Digimon 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18. Batavito 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19. Biofibras 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20. Biofibras 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21. Fruty 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22. Neston 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23. Digimon 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24. Lactofos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
25. Chamyto 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26. Digimon 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27. Digimon 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28. Digimon 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29. Digimon 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30. LC1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31. Digimon 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32. LC1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33. KCTC 3111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34. KCTC 3138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35. KCTC 1058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36. KCTC 3216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* **Identificação das culturas isoladas de produtos (API 50CH):** 1, 2, 3 = *L.acidophilus*, 4,5,6,7, = *L.rhannosus*, 8, 9, 10, 11, 12, 13 = *L.paracasei* subsp.*paracasei*, 14, 15 = *L.delbrueckii* subsp. *lactis*, 16 = *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, 17 = *L.curvatus* subsp.*curvatus*, 18, 19, 20, 21, 22 = *Streptococcus thermophilus*, 23, 24 = *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31= *L. mesenteroides* subsp.*cremoris*, 32 = *Leuconostoc lactis*. **Identificação de catálogo das culturas padrão:** 33= *Lactobacillus acidophilus*, 34 = *Lactobacillus gasseri* (*L.acidophilus*), 35 = *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*lactis*, 36 = *Bifidobacterium adolescentis*

5.9 TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Uma vez que a maioria das bacteriocinas são resistentes ao aquecimento presume-se que as culturas avaliadas não produziram esses compostos nas condições do experimento anterior (tratamento térmico do sobrenadante). Dessa forma, procurou-se demonstrar o antagonismo contra algumas espécies de bactérias patogênicas Gram negativas (*E. coli* e *Salmonella*) e Gram positivas (*S. aureus* e *Listeria*). Neste caso, utilizou-se o mesmo método de difusão em poços, porém, o sobrenadante não foi submetido ao tratamento térmico (95°C/10 minutos).

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 mostraram que uma cepa de *L.rhamnosus* (Lactofos 2) promoveu a inibição de *Listeria* (halo de 1mm) e outra cepa de *L.rhamnosus* (Fruty-1) promoveu a inibição de *Listeria* (halo de 1mm) e *S. aureus* (halo de 0,8mm). Não se observou inibição das bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella*). De acordo com Moreno *et al.* (1999) e Tramer (1966), as bacteriocinas de bactérias lácticas normalmente não apresentam atividade contra microrganismos Gram-negativos nem contra bolores e leveduras.

Tabela 4.6. Inibição de bactérias patogênicas por culturas lácticas isoladas de produtos brasileiros

Cepa	Halo de inibição contra bactérias patogênicas (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L.monocytogenes</i>
LC1-1 (<i>L. acidophilus</i>)	-	-	-	-
Lactofos-2 (<i>L. rhamnosus</i>)	-	-	-	1,0*
Fruty-1 (<i>L. rhamnosus</i>)	-	0,8*	-	1,0*
Biofibras-10 (<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>)	-	-	-	-
Digimon-1 (<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>)	-	-	-	-
Digimon-6 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>)	-	-	-	-
Chamyto-1 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>)	-	-	-	-
Digimon-8 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>)	-	-	-	-
Lactofos-6 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>)	-	-	-	-

* Em mm

O antagonismo de culturas probióticas contra bactérias patogênicas foi amplamente relatado por vários autores. Bernardeau *et al.* (2001) observaram que a susceptibilidade das bactérias patogênicas variou em relação a espécie produtora da bacteriocina avaliada. O *Lactobacillus acidophilus* não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* como também apresentado neste estudo para a cultura isolada do produto LC1. As culturas com propriedades probióticas comprovadas, como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei rhamnosus* Antibiophilus®, *Lactobacillus acidophilus* MA27/6R e *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B foram mais ativas contra as Gram-negativas *E. coli* e *S. typhimurium* que a Gram-positiva *L. monocytogenes*. Neste estudo duas culturas foram mais ativas contra *L. monocytogenes* (Gram-positiva). Jacobsen *et al.* (1999) analisando 47 culturas de *Lactobacillus* de diferentes origens obtiveram propriedades antimicrobianas variáveis entre as culturas, sendo que muitas delas mostraram fraca ou nenhuma inibição contra *S. aureus* e *S. typhimurium* como também mostrado neste estudo.

É citado na literatura que as bacteriocinas de bactérias lácticas não apresentam atividade contra microrganismos Gram-negativos e nem contra bolores e leveduras, característica esta evidenciada por outros pesquisadores (Moreno *et al.*, 1999; Tramer, 1966). Isso se deve a proteção conferida pela camada LPS característica das bactérias Gram-negativas (Chen and Hoover, 2003). Contudo, outros agentes antimicrobianos podem inibir esses microrganismos, conforme observado para *E. coli* e *Salmonella typhimurium* por Lui *et al.* (1999), que atribuíram esse efeito à ação do lactato ou algum outro composto não conhecido. Portanto, a inibição de *S. aureus* e de *Listeria* observada neste estudo pode ser devida à presença de outro agente inibidor que não as bacteriocinas e nem os ácidos orgânicos. Como no método utilizado células viáveis remanescentes das culturas lácticas e das bactérias patogênicas se desenvolvem ao mesmo tempo, pode-se aventar a hipótese dessa inibição ter sido causada pela competição pelo substrato. Resultados apresentados por Guerra e Bernardo (2001) mostraram que o fator competição ocorreu numa maior frequência entre as culturas lácticas do que a produção de substâncias

antimicrobianas. De 531 culturas isoladas a partir de queijos, eles verificaram que 208 delas inibiram *Listeria*, sendo 60,6% decorrente da competição por nutrientes, 12% pelos ácidos orgânicos, 17,8% do peróxido de hidrogênio, 6,7% pelos dois tipos de compostos e 2,9% por substâncias filtráveis não identificadas.

Este trabalho confirma a baixa frequência de produção de bacteriocinas pelas culturas lácticas isoladas dos produtos probióticos comercializados no Brasil com atividade determinada contra culturas relacionadas.

As culturas probióticas devem apresentar a capacidade de colonização do trato intestinal para a promoção dos efeitos benéficos desejáveis. Assim, culturas que apresentam a característica de produção de compostos antimicrobianos teriam uma vantagem competitiva sobre os outros microrganismos habitantes do trato intestinal. Como essa atividade antagônica deve ser restrita aos microrganismos patogênicos, a inibição de bactérias patogênicas atribuída ao fator competição pelo substrato, dentre as quais, *L. monocytogenes* e *S. aureus* pelas duas culturas identificadas como *Lb. rhamnosus*, previamente isoladas a partir de iogurte e de um suplemento é muito mais interessante.

Muitos estudos têm sido realizados nesta última década para a procura de novas bacteriocinas que apresentem um amplo espectro de atividade contra microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes para assegurar a qualidade de uma variedade de produtos. No caso específico dos produtos probióticos, parece ser desejável que essas bactérias além de apresentarem a característica de proteção ao produto, apresentem a capacidade de adaptação e desenvolvimento no trato intestinal. Assim, a vantagem conferida pela competição por substratos por bactérias benéficas deve ser melhor explorada para esta finalidade.

6. CONCLUSÕES FINAIS

6.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CULTURAS

Ao contrário de alguns produtos encontrados na Europa mencionado por Temmerman *et al* (2002), todos os produtos brasileiros analisados apresentaram células viáveis, no entanto várias delas não apresentaram viabilidade após a reativação e congelamento não permitindo suas identificações.

Os meios de culturas utilizados para o isolamento das culturas (HHD, LA e BIM-25) permitiram através da observação das colônias identificar algumas espécies com muita dificuldade, como se segue:

As colônias isoladas do meio HHD apresentaram colônias com coloração transparente, branca, verde e azul. Algumas colônias apresentaram um ponto central verde ou azul com borda branca ou transparente. A viragem do meio quando presente, foi amarela ou verde. O tamanho das colônias variou de puntiforme até 5mm (maioria entre 1 a 3mm). De acordo com a referência (IDF 306) as colônias de morfologia grande, centro azul e circunferência branca correspondem ao *L. acidophilus*, neste caso os produtos Chamyto (2HHD), Digimon (3HHD), Parmalat (1HHD) e Sabores (2HHD) apresentaram colônias típicas. Para o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* a referência menciona colônias com coloração azul, neste caso, somente o produto Digimon (2HHD) apresentou colônia típica. Colônias de bifidobactérias de acordo com o IDF são brancas, neste caso somente o produto Fruty (4HHD) apresentou colônia típica, mas esta não foi recuperada após o seu isolamento.

As colônias isoladas do meio LA apresentaram coloração branca, marron, cinza e creme. As colônias possuíam bordas branca, cinza e marrom, sendo que a viragem do meio para o marrom (ou cor chocolate bem característico). Com relação ao tamanho, forma, elevação e brilho todas apresentaram variações. De acordo com a referência (IDF 306) as colônias com morfologia plana, acinzentadas e grandes são *L. acidophilus*, o produto Biofibras (3LA) apresentou

colônia com esta morfologia. Para as colônias com coloração cor de chocolate com elevação, o IDF 306 relata como sendo de *B. bifidum* e *B. longum*, neste caso os produtos Biofibras (2LA, 5LA), Neston (6LA), Lactofós (6LA) e LC1 (3LA, 7LA e 8LA) apresentaram colônias típicas, algumas perdidas no isolamento e outras em decorrência do seu tamanho (puntiforme) foram relatadas como planas. O *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentam colônias elevadas, brancas e grandes segundo a referência do IDF. Neste caso nenhum produto apresentou colônia típica. O IDF 306 menciona que o *S. thermophilus* não cresce bem neste meio, mas quando ocorre, o crescimento as colônias são puntiformes. Os produtos Neston (6LA), Lactofós (6LA) e LC1 (3LA) apresentaram colônias que se enquadram nesta morfologia, porém, somente a colônia do Lactofós 6LA permaneceu ativa após o isolamento.

As culturas identificadas como *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou *L. acidophilus* não apresentavam, no meio de isolamento diferencial (HHD ou LA) as características descritas para essas espécies. Esses resultados indicaram que as características das colônias não se mostraram um critério confiável para distinguir as culturas presentes nas amostras.

As colônias isoladas do meio Bim-25 apresentaram coloração vinho (bordô ou pink) algumas apresentaram uma pequena borda com tom branco ou transparente. Não houve viragem do meio em nenhuma placa de isolamento. De acordo com Munoa & Pares (1988), colônias que são brancas com o diâmetro que claramente excedem a 2mm são *Bifidobacterium* sp e colônias pink são formadas por cocos, bifidobacteria e bacilos. No caso de colônias brancas nenhum produto apresentou colônia típica e no caso de colônias pink (vinho/bordô), os produtos Biofibras (8BIM, 9BIM e 10BIM) e Lactofós (4BIM) apresentaram colônias típicas, mas utilizando-se somente a observação morfológica não podemos relacioná-las as bifidobactérias como mostrado nos testes de fermentação de carboidratos (API) e teste da enzima F6PPK.

Nenhuma cultura isolada do BIM-25 foi identificada como *Bifidobacterium* (API ou Riboprinter), indicando que, embora esse meio seja relatado como seletivo para bifidobactérias, outras espécies podem crescer.

Pela identificação fenotípica a maioria dos produtos analisados demonstrou incorporar mais de uma cultura láctica em sua fabricação. A maioria também demonstrou a presença de pelo menos uma espécie de *Lactobacillus* reconhecida por conter culturas probióticas - *L. paracasei* subsp. *paracasei* em 6 produtos, *L. rhamnosus* em 2 produtos e *L. acidophilus* em 2 produtos.

A identificação com o API 50CHL (BioMerieux) agrupou as culturas isoladas em 12 espécies ou subespécies, sendo encontradas:

- 1º) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* – isolado de 6 produtos,
- 2º) *Streptococcus thermophilus* – isolado de 4 produtos,
- 3º) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* – isolados de 3 produtos,
- 4º) *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* – isolados de 2 produtos cada,
- 5º) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* – isolados de 1 produto cada.

A identificação do API 50CHL nem sempre coincidiu com a esperada pela morfologia das culturas. Várias culturas inicialmente caracterizadas como bastonetes foram identificadas como espécies cuja morfologia é de cocos (*Streptococcus*, *Lactococcus* ou *Leuconostoc*). Na identificação pelo Riboprinter, o resultado obtido para essas culturas discordou do API mas concordou com a morfologia da cultura.

Os testes fenotípicos utilizados (Gram, catalase, motilidade, enzima F6PPK e API) devem ser considerados para as identificações preliminares de bactérias ácido lácticas, entretanto, cuidados especiais devem ser levados em

consideração, pois como eles são dependentes da expressão gênica, podem sofrer variação em algumas situações.

6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS

A ribotipagem com o Riboprinter (Dupont/Qualicon) agrupou as culturas isoladas em 8 ribogrupos, sendo encontradas as espécies:

- 1º) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* – isolado de 6 produtos,
- 2º) *Lactobacillus rhamnosus* – isolado de 4 produtos
- 3º) *Streptococcus thermophilus* – isolado de 2 produtos,
- 4º) *Lactobacillus* sp, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium* – isolados de 1 produto cada

Nem todas as culturas submetidas à ribotipagem foram identificadas - de 41 analisadas, o Riboprinter não conseguiu gerar o ribotipo de duas e não identificou cinco, embora tenha gerado o ribotipo.

A identificação do Riboprinter nem sempre concordou com a do API 50CHL. De 27 culturas identificadas pelos dois métodos, os resultados concordaram na identificação de 17 (63%) e discordaram na identificação de 10 (37%). Os resultados discordantes concentraram-se naquelas identificadas pelo API 50CHL como *Leuconostoc (mesenteroides* subsp. *cremoris* ou *lactis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As culturas com resultados concordantes concentraram-se naquelas identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

De duas culturas padrão de *Bifidobacterium* tipadas pelo Riboprinter, uma foi corretamente identificada (*Bifidobacterium bifidum* KCTC 3440) e uma não (*Bifidobacterium subtile* ATCC 27537, identificada como *Enterococcus faecium*).

De sete culturas padrão de *Bifidobacterium* identificadas pelo API 20A para bactérias anaeróbias, apenas uma foi corretamente identificada, ao nível de gênero (*Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* ATCC 25526, identificado como *Bifidobacterium* sp). Para as demais, a identificação foi incorreta mesmo ao nível de gênero, demonstrando a quase total inadequação das chaves desse “kit” para as bifidobactérias.

A identificação do Riboprinter raramente discordou com a esperada pela morfologia das culturas, havendo apenas um caso em que isso ocorreu - na identificação da cepa padrão de *Bifidobacterium subtile* ATCC 27537 (bastonete), identificada como *Enterococcus faecium* (coco).

6.3 PRÉ-REQUISITOS MÍNIMOS E OBSERVAÇÕES DE ROTULAGEM DOS PRODUTOS BRASILEIROS

Embora as culturas deste experimento apresentem baixa resistência nos pHs 1 e 2, deve-se considerar que em determinadas condições o pH gástrico pode ser menor e a resistência pode ser diminuída. Porém, considerando-se que o veículo carreador de organismos probióticos geralmente é o leite desnatado ou iogurtes, que ajudam a aumentar o pH gástrico, a resistência pode ser aumentada devido à influência de substâncias protetoras presentes nesses produtos. É importante ressaltar ainda que a perda de viabilidade das culturas não é restrita somente aos produtos brasileiros mas em vários outros produtos comercializados em todo o mundo.

Quando a sensibilidade à bile (Oxgall), as culturas apresentaram-se mais resistentes podendo ser consideradas sob esse aspecto, potencialmente probióticas. A cultura padrão KCTC 3105 - *L. plantarum* foi entre todas as culturas padrão analisadas a mais resistente aos tratamentos com sais biliares (mais que 20% de recuperação), podendo exercer ação probiótica em relação a sua sobrevivência nestas condições de tratamento. Comparando-se este resultado

com os obtidos para as 15 melhores culturas isoladas dos produtos analisados os quais apresentaram as melhores respostas podemos concluir que estas culturas podem ser consideradas probióticas, apresentado mais que 20 a 30% de recuperação.

Nenhuma cultura (produto e padrão) produziu bacteriocinas, não podendo ser classificadas como probióticas. Com relação ao antagonismo contra bactérias patogênicas somente uma cultura (*L. rhamnosus*) foi capaz de exercer efeito inibitório.

Quanto a adequação de rótulos e nomenclaturas das culturas temos: a) nem todas as espécies declaradas nos rótulos foram encontradas nos produtos, particularmente *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*; b) várias espécies não declaradas em rótulo foram encontradas nos produtos, incluindo-se *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (identificação do API 50CHL); e c) a nomenclatura das espécies em rótulo estava ultrapassada em vários produtos, particularmente *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, declarados como *Lactobacillus casei*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.T.; VORA, P., FAURE, E.; THOMAS, L.S.; ARNOLD, E.T.; ARDITI, M. Decreased expression of toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1609-16, 2000.

AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA of *Lactobacillus*. **Microecol. Ther.**, v. 26, p. 27-30, 1997.

ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRATE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 46, p. 71-79, 1999.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ALI, D.; LACROIX, C.; THUAULD, D.; BOURGEOIS, C.M.; SIMOND, R.E. Characterization of diacetin b, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.832-841, 1995.

ANAND, S.K.; SRINIRASAN, R.A.; RAO, L.K. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium longum*. **Cult. Dairy Prod. J.**, v.19, p.6-8, 1984.

ANON, **Healthy eating bio yoghurts**: Potted Health. Health Which?, June, p.92-95, 1997.

ANONYMOUS. Yoghurt and probiotics. **Choice**, v. 11, p. 32-35, 1992.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Resolução Nº 02 de 07 de janeiro de 2002.

APAJALAHTI, J.H.A.; KETTUNEN, A.; NURMINEN, P.H.; JATILA, H.; HOLBEN, W.E. Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5731-5735, 2003.

ARROYO, L., COTTON, L.N. & MARTIN, J.H. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B.infantis* and *B.longum* from pure culture. **Cult.Dairy Prod.J.**,v. 29, n.5, p.20-24, 1994.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **SALMINEN, S., WRIGHT, A.**, (EDS.). *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.1, p.1-63.

BAHAKA, D.; NEUT, C.; KHATTABI, A.; MONGET, D.; GAVINI, F. Phenotypic and genomic analysis of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. **Int. Journal Syst. Bacteriol.**, v. 43, p. 565-573, 1993.

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and probiotic action. In: **SALMINEN, S. & VON WRIGHT, A.** (Eds.). *Lactic Acid Bacteria*. p.357-428, Marcel Dekker, New York, 1993.

BARRE, P. Taxonomie numérique de lactobacilles isolés du vin. **Archives fur Mikrobiologie**, v. 68, p. 74-86, 1969.

BARRETO, G.P.M., SILVA, N., SILVA, E.N. *et al.*,. Monitoramento da viabilidade de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Submetido para publicação no **Brasilian Journal of Food Technology**, 2002.

BEIJERINK, M.W. Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry.) **Arc Néerland des Sciences Extractes et Naturelles**. v. 6, p. 212-43, 1901 (in French).

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Volume 1. Noel R. Krieg (editor). Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BERNER, L.A.; O'DORNELL, J.A. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 355-362, 1998.

BERNET, M-F.; BRASSART, D.; NESSER, J-R.; SERVIN, A.L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 12, p. 4121-4128, 1993.

BERKHIN, P. Survey of clustering data mining techniques. **Relatório técnico, Accrue Software**, San Jose, CA, 2002.

BERRADA, N.; LEMELAND, J.F.; LAROCHE, G.; THOUVENOT, P.; PIAIA, M. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. **J. Dairy Sci.**, v. 74, n. 2, p. 409-413, 1991.

BERTHIER, F.; EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that the 16S/23S rRNA spacer region. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 161, p. 97-106, 1998.

BESHKOVA, D. Production of amino acid by yogurt bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 6, p. 963-995, 1998.

BETZL, D.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Identification of lactococci and enterococci by colony hybridisation with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2927-2929, 1990.

BIAVATI, B.; SCARDOVI, V.; MOORE, W.E.C. Electrophoretic patterns of protein in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 358-373, 1982.

BIAVATI, B.; SCORBATI, B.; SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: The Prokaryotes, eds. **A. BALOWS; H.G. TRIPER; M. DOWIKAN; W. HARDER; K. SCHLEIFER**. Springer, London, pp. 814-829, 1992.

BINGEN, E.H.; DENAMUR, E.; ELION, J. - Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7: 311-27, 1994.

BIRREN, B. & LAI, E. - **Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide**. San Diego, Academic Press, 1993. 253pp.

BJÖRKROTH, J. & KORKEALA, H. rRNA gene restriction patterns as a characterisation tool for *Lactobacillus sake* producing ropy slime. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 30, p. 293-302, 1996.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; GAUTHIER, S.F. Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 1421-1429, 1995.

BODANA, A. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, 73(12): 3379-3384, 1990.

BOGDANOV, I.G. Antitumor action of glycopeptides from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. **Nol Biologii Meditsiny**, v. 84, n. 12, p. 709-712, 1977.

BOGDANOV, I.G.; DALEV, P.G.; GUREVICH, A.I. et al. Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 57(3): 259-261, 1975.

BONAPARTE, C. **Selective isolation and taxonomic position of bifidobacteria isolated from commercial fermented dairy products in central Europe**. 1997. Dissertation. Technische Universität - Berlin, 1997.

BONAPARTE, C.; REUTER, G. Bifidobacteria in commercial dairy products: Which species are used? In: **Proceedings of the Symposium Probiotics in Man and Animal**, Berlin, June 20-22, 1996. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Berlin, p. 33.

BOTTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 303-315, 1988.

BOTTAZZI, V. Yoghurt, latte-fermentati, probiotici e funzionali. **L'industria del latte**, v. 33, p. 3-13, 1997.

BOTTAZZI, V.; ZACCONI, C.; SARRA, P.G. (Eds.) **Probiotica con Batteri Lattoci**. p. 37-86, Milano, Italia: Futurgraf, 1985.

BROOK, I. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 45, p. 21-26, 1996.

BRUCE, J.L. - Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. **Food Technology**, **50**: 77-81, 1996.

BUCHANAN, R.E.; GIBBSON, N.E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1974.

CÂNDIDO, L.M.B. & CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim da Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.29, n.2, p.193-203, 1995.

CANGANELLA, F.; PAGANINI, S.; OVIDI, M.; VETTRAIANO, A.M.; BEVILACQUA, S.; MASSA, S.; TROVATELLI, L.D. A microbiological investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. **Microb. Res.**, v. 152, p. 171-179, 1997.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v.50, p.131-149, 1999.

CASAS, I.A. & DOBROGOSZ, W.J. *Lactobacillus reuteri*: an effective animal probiotic. In: **Proceedings of Symposium Probiotics in Man and Animal**, Berlin, June, 20-22, 1996.

CATO, E.P.; MOORE, W.E.C.; JOHNSON, J.L. Synonymy of strains of *Lactobacillus acidophilus* group A2 (Johnson *et al.* 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.33, p. 426-428, 1983.

CHAMPAGNE, C.P.; ROY, D.; LAFOND, A. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. **Biotechnol. Tech.**, v. 11, p. 567-569, 1997.

CHANG, Y-H.; KIM, J-K.; KIM, H-J.; KIM, W-Y.; KIM, Y-B.; PARK, Y-H. Selection of potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 193-1999, 2001.

CHARTERIS, W.; KELLY, P.; MORELLI, L.; COLLINS, K. Ingredient selection for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, p. 123-136, 1998.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 1-27, 1997.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37°C. **J. Basic Microbiol.**, v.41, n. 5, p. 241-51, 2001.

CHAVES, A.H., SILVA, J.F.C., PINHEIRO, A.J.R., FILHO, S.C.V., CAMPOS, O.F. Seleção de *Lactobacillus acidophilus* para probiótico em bezerros. **Anais da XXXIV Reunião da SBZ**. 1997.

CHEN H. AND HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.2, p. 82-100, 2003.

CHEVALIER, P.; ROY, D.; SAVOIE, L. X- α -Gal-based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 75-83, 1991.

CHEVALIER, P.; ROY, D.; WARD, P. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 619-624, 1990.

CHIN, H.S.; SHIM, J.S.; KIM, J.M.; YANG, R.; YOON, S.S. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Food Science and Biotechnol.**, v.10, n.4, p.335-341, 2001.

CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p. 23-31, 1999.

CIAA, *Code of Practice on the Use of Health Claims (1999)*. CIAA, Belgium.

CLARK, P.A., MARTIN, J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III – tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. **Cult. Dairy Prod. J.**, v.29, p.18-21, 1994.

CLARK, P.A.; COTTON, L.N.; MARTIN, J.H. Selection of *Bifidobacterium* spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II tolerance to simulated pH of human stomachs. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 28 , n. 4, p. 11-14, 1993.

CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v.71, p.1-20, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (1993-2000). Reports of the Twenty-Second through Twenty-Eighth sessions of the Codex Committee on Food Labeling (ALINORM 93/22-01/22). Rome, Italy: FAO/WHO.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. (Eds.) **Dairy starter cultures**. pp.233-248. USA: VCH Publishers Inc. (Chapter 9), 1996.

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

COLLINS, M.D.; PHILLIPS, B.A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 105-108, 1989.

COLLINS, M.D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J.A.E.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.; PHILLIPPS, B.A.; WILLIAMS, A.M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 77, p. 5-12, 1991.

CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDEN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v. 70, p. 1-12, 1987.

COSTELLO, M. Probiotic Foods. **The Food Industry Conference Proceedings, Food Pro 93, International Food Processing Machinery and Technology Exhibition and Conference**. Sydney, Australia, 12-14 July, p. 10-16, 1993.

COVENTRY, M. J., MUIRHEAD, K., HICKEY, M. W. Partial characterization of pediocin PO2 and comparison with nisin for biopreservation of meat products. **Int. J. Food Microbiol.**, v.26, p.133-145, 1995.

CROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M.M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 199-210, 1994.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **J. Applied Bacteriol.**, v.70, p.443-459, 1991.

D'AGATA,E.M.; GERRITS,M.M.; TANG,Y.W.; SAMORE,M.; KUSTERS,J.G. - Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment-length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **22**: 550-4, 2001.

DASH, M. & LIU, H. Efficient hierarchical clustering algorithms using partially overlapping partitions. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 2035, p. 495-506, 2001.

DAUD, K.A.K.; NEILIAN, B.A.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P.L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153, p. 191-197, 1997.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **Int. Dairy Journal**, v. 7, p. 435-443, 1997a.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made with commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, v. 7, p. 537-545, 1997.

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.**, v. 79, p. 1529-1536, 1996.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DENTON,M.; TODD,N.J.; KERR,K.G.; HAWKEY,P.M.; LITTLEWOOD,J.M. - Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 1953-8, 1998.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria*. In: **DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J.** (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional. London, p.91-142, 1994a.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications**. Blackie Academic and Professional. London, 536 p., 1994b.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. *Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance*. In: **DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J.** (eds). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Application*. Chapman & Hall, New York., p. 1-12, 1994c.

DEETH, H.C. & TAMINE, A.Y. Yoghurt: nutritive and therapeutic aspects. **Journal of Food Protection**, v.44, p.78-86, 1981.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L.M.T.; DU TOIT, M.; TORRIANI, S. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al. 1989). Request for an opinion. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 340-342, 1991.

DELLAGLIO, H., ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C., JANSSENS, D. *Caractéristiques générales des bactéries lactiques*. In: **ROISSART, H., LUQUET, F.M.**, eds. Bactéries lactiques. aspects fondamentaux et technologiques. Paris: Lorica, 1994. v.1, p.25-139.

DESMAZEAUD, M.J. & ROISSART, H. de. *Métabolisme general des bacteries lactiques*. In: **ROISSART, H. de & LUQUET F.M.** (Eds). Bactérie Lactique. Lorica, Paris, p. 169-204, 1997.

DICKS, L.M.T.; DU PLESSIS, E.M.; DELLAGLIO, F.; LAUER, E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the names *Lactobacillus paracasei*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, n. 1, p. 337-340, 1996.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 2854-2864, 1994.

DOBROGOSZ, W.J. & CASAS, I.A. *Lactobacillus reuteri*: na effective human probiotic. In.: **Proceedings of the Symposium Probiotics in Man and Animal**, June, 20-22, 1996.

DONG, X.; YUHUA, X.; JIAN, W.Y.; LIU, X.L.; LING, D.W. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from na anaerobic digester. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 119-125, 2000.

DONOHUE, D.C.; SALMINEN, S. Safety of probiotic bacteria. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, p. 25-28, 1996.

DRIESSEN, F.M.; DE BOER, R. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 43, p. 367-382, 1989.

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.**, 73(suppl): 386S-92S, 2001.

DU PLESSIS, E.M.; DICKS, L.M.T. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. **Curr. Microbiol.**, v. 31, p. 114-118, 1995.

ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M. MCFALAND, L.V. Biotherapeutic agents: a neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **J. Amer. Med. Assn.**, v.275, p. 870-876, 1996.

ENGESSER, D.M.; HAMMES, W.P. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 19, p. 763-776, 1994.

EVANS, J.B. & NIVEN, C.F.J. Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. **J. Bacteriol.**, november, v.62, n.5, p.599-603, 1951.

FANEDL, L., NEKREP, F.V. & AVGUSTIN, G., Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. **Can.J. Microbiol.**, v. 44, p. 1094-1001, 1998.

FARAH,S.B. - DNA no diagnóstico das doenças infecciosas. In: FARAH,S.B. - **DNA Segredos e Mistérios**. 3rd ed. São Paulo, Sarvier, 1997. p.103-40.

FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas-caracterização tecnológica e aplicação de bactérias probióticas. In: **FERREIRA, C.L.L.F.** (Ed) Prebióticos e Probióticos:atualização e prospecção. Viçosa: cap. 1, p.7-33, 2003.

FERREIRA, C.L.L.F. Produtos lácteos de terceira geração: importância de produtos contendo bactérias bífidas. **Leite & Derivados**, v.29, p.22-28, 1996.

FERRERO, M.; CESENA, C.; MORELLI, L.; SCOLARI, G.; VESCOVO, M. Molecular characterisation of *Lb. casei* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 140, p. 215-219, 1996.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. **Int. Dairy J.**, v.9, p. 53-61, 1999.

FRETER, R. Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. **J. Exp. Med.**, v. 104, p.104-8, 1956.

FRIEDRICH, M. A bit of culture for children: probiotics may improve health and fight disease. **The Journal of the American Medical Association**, 284(11): 1365-1370, 2000.

FROTHINGHAM, R.; DUNCAN, A.J.; WILSON, K.H. Ribosomal DNA sequences of bifidobacteria: implications for sequence-based identification of the human colonic flora. **Microbiol. Ecology Health Dis.**, v. 6, p. 23-27, 1993.

FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; YAESHIMA, T.; MITSUOKA, T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). **Int. Journal Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 487-491, 1992.

FULLER, R. A review: Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, n. 5, p.365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics: The Scientific Basis**. Chapman & Hall, New York, NY, 1992.

GÄNZLE, M.G. **Useful properties of Lactobacilli for application as protective cultures in food**. University of Hohenheim, Germany, 160p., 1998 (Tese PhD).

GARVIE, E.L.; COLE, C.B.; FULLER, R.; HEWITT, D. The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 56, p. 237-245, 1984.

GASSER, F. Eletrophoretic characterization of lactc dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 62, p. 223-239, 1970.

GAVINI, F.; POURCHER, A.-M.; NEUT, C.; MONGET, D.; ROMOND, C.; OGER, C.; IZARD, D. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 548-557, 1991.

GHODDUSI, H.B.; ROBINSON, R.K. Enumeration of starter cultures in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 151-158, 1996.

GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. 209S-212S, 1998.

GIBSON, G.R. & ROBERFROID, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **J.Nutr.** 125:1401-1412.

GIBSON, G.R.; WILLIANS, C.M. Gut fermentation and health advantagens: myth or reality? **British J. Nutr.**, v.81, p.83-84, 1999.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 377-381, 1985.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2483-2494, 1989.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **J. Food Prot.**, v. 42, n. 2, p. 164-167, 1978.

GILLILAND, S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 175-188, 1990.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Enumeration and identity of lactobacilli in dairy products. **J. Food Prot.**, v. 40, n. 11, p. 760-762, 1977a.

GILLINGS, M. & HOLLEY, M. - Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Lett. Appl. Microbiol.**, **25**: 17-21, 1997.

GIRAFFA, G.; VECCHI, P. De.; ROSSI, P.; NICASTRO, G.; FORTINA, M.G. Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *Journal of Applied Microbiology*, v. 85, p. 411-416, 1998.

GIRAUD, E.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, p. 96-99, 1991.

GODERSKA, K.; CZARNECKA, M.; CZARNECKI, Z. Survival rate of chosen *Lactobacillus* bacteria type in media of different pH. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, **Food Science and Technology**, v. 5, Issue 1, 2002. Disponível em: <http://www.ejpau.media.pl>. Acesso em: 25 de novembro de 2001.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. *Probiotics for humans*. In: Probiotics, the Scientific Basis, ed. **R. FULLER**. Chapman & Hall, London, pp. 355-376, 1992.

GOLDIN, R.B.; GORBACH, S.L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEN, S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Science**., v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.

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

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 1492-1507, 1998d.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Use of small ruminants' milks supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 839-948, 1998c.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; KLAVER, F.A.M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2817-2825, 1998a.

GOMES, A.M.P.; TEIXEIRA, M.G.; MARCATA, F.X. Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 22, p. 221-240, 1998b.

GOODFELOW, M. & MINNIKIN, D.E. **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 401p. 1985.

GORDON, H.A. & PESTI, L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host relationships. **Bacteriological Reviews**, 35:390-429, 1971.

GRENOV, B. In: SHAH, N.P. Isolation and enumeration of bifidobacterias in fermented milk products: a review. **Milchwissenschaft**, v.52, p.72-76, 1997.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.D.A. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction as potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 137B, p. 165-175, 1986.

GRUNDMANN, H.; SCHNEIDER, C.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F.D.; PITT, T.L. - Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 528-34, 1995.

GUARNER, F.; SCHAAF SMA, G.J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 237-238, 1998.

GUERRA, N.P.; CASTRO, L.P. Production of bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.36, p.119-125, 2002.

GUIMARÃES, R.C. Estrutura e função do RNA. In: **COSTA, S.O.P.** Genética Molecular e Microorganismos – Os Fundamentos da Engenharia Genética, Cap. 3, São Paulo: Editora Manole Ltda, 1987.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A. Characterization of the inhibitors effects of *L. monocytogenes* Scott a produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 96, n. 538, p. 65-69, 2001.

GURR, M.I. Nutritional aspects of fermented milk products. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 46, p. 337-342, 1987.

GURTLER, V. & STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v. 142, p. 3-16, 1996.

GUSTAFERRO,C.A. & PERSING,D.H. - Chemiluminescent universal probe for bacterial ribotyping. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 1039-41, 1992.

HAGLER, L.C.M. & HAGLER, A.N. Taxonomia de microrganismos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDOI, J.L. Tratado de Microbiologia, São Paulo: Manole, v.2, p.106-122, 1991.

HAMILTON-MILLER, J.M.T.; SHAH, S.; SMITH, C.T. "Probiotic" remedies are not what they seem. **Br. Med. J.**, v. 312, p.55-56, 1996.

HAMILTON-MILLER, J.M.; SHAH, S.; WINKLER, J. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of food and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutr.**, v. 2, p. 223-229, 1999.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. The Lactic Acid Bacteria, v. 2, The Genera of Lactic Acid Bacteria, **WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H.** (Eds.), pp. 19-54, Blackie Academic, London, 1995.

HANSEN, L.T., ALLAN-WOJTAS, P.M., PAULSON, A.T. Tolerance of *Bifidobacterium* spp. as free cells or as encapsulated in calcium-alginate microspheres to simulated gastro-intestinal conditions. In: **Conf. of the Internat. Committee on Food Microbiol. & Higiene**. Chapter 12 Probiotics, p.864-867, 1999.

HARTEMINK, R.; KOK, B.J.; WEENK, G.H.; ROMBOOTS, F.M. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **J. Microbiol. Methods**, v. 27, p. 33-43, 1996.

HASTINGS, J.W.; HOLTZAPFEL, W.H. Numerical taxonomy of lactobacilli surviving radurization of meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p. 33-49, 1987.

HAUSER, M.M.; SMITH, R.E. The characterization of lactobacilli from cheddar cheese. II. a numerical analysis of the data by means of an electronic computer. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 757-762, 1964.

HAVENAAR, R.; BRINK, T.B.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Selection of strain for probiotic use. In: Probiotics: Scientific Basis, ed. **R. FULLER**. London, Chapman and Hall, pp. 260-295, 1992.

HAYFORD, A.E.; PETERSEN, A.; VOGENSEN, F.K.; JAKOBSEN, M. Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p. 3213-3221, 1999.

HEATLEY, R.V.; SOBALA, G.M. Acid suppression and the gastric flora. **Baillière's Clin. Gastroenterol.** 7:167, 1993.

HEKMAT, S.; MCMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 1415-1422, 1992.

HENSIEK, R.; KRUPP, G.; STACKEBRANDT, E. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, p. 123-128, 1992.

HITCHINS, A.D. & MCDONOUGH, F.E. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.675-684, 1989.

HOIER, E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. **Food Australia**, v. 44, p. 418-420, 1992 a.

HOLCOMB, J.E.; FRANK, J.F.; MCGREGOR, J.U. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in soft serve frozen yogurt. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 26, p. 4-5, 1991.

HOLLIS,R.J.; BRUCE,J.L.; FRITSCHER,S.J.; PFALLER,M.A. - Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **34**: 263-8, 1999.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALAEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Gram positive cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. **HOLT, J.C.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.; STALEY, J.T.; WULLIAMS, S.T.** (Eds.), 527p., 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

HOLTZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **Int J. Food Microbiol.**, v.41, p.85-101, 1998.

HOLTZAPFEL , W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and importante features of probiotic microrganisms in food and nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 2 suppl., p. 365S-373S, Feb. 2001.

HOLTZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U.; Du TOIT, M.; DICKS, L.M.T. Systematics of probiotic lactic acid bacteria with reference to modern phenotypic and genomic methods. In: **Proceedings of the Symposium Probiotics in Man and Animal**, Berlin, June 20-22, 1996. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Berlin, p.11.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. **J. Food Sci.**, v. 53, p. 1514-1516, 1988.

HOOVER, D.G. Bifidobacteria: activity and potential benefits. **Food. Technol.**, v. 47, n. 6, p. 120-124, 1993.

HOSONO, A. Fermented Milk in the Orient'. In: **Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences**, p. 61-78, Elsevier Science Publishers Ltd., Barking, 1992.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci.**, v.49, p.1537-1542, 1998.

HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. **Food Technol.** v.45, n. 4, p.74-83, 1991.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; SHORTT, C. Selection criteria for probiotic microorganisms in gut flora and health-past, present and future. In: **The Royal Society of Medicine Press Ltd**, International Consortium and Symposium Series. v.6, p. 27-36, 1996.

HULL, R.R.; ROBERTS, A.V. Differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 39, p. 160-163, 1984.

HUNGER, W. Aesculin-cellobiose agar for the isolation and counting of *Lactobacillus acidophilus*. **Milchwissenschaft.**, v. 41, n. 5, p. 283-285, 1986.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: **BRANEN, A.L. & DAVDSON, P.M.** (Eds). Antimicrobial in Foods. Marcel-Deker, Inc., New York, 1983, p. 327-351.

HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, p. 85-123, 1981.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION BULLETIN. N° 179, Brussels, Belgium, 1984.

IDF/ISO/AOAC GROUP E-104, 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin of the IDF** 306:23-33.

IDF/ISO/AOAC GROUP E-104, 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin of the International Dairy Federation** 306, Int. Dairy Federation, Brussels, Belgium, p. 23-33.

IBRAHIM, S.A., BEZKOROVAINY, A. A survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. **J. Sci. Food Agricult.**, v.62, p.351-354, 1993.

IGARASHI, M.; LIYAMA, Y.; KATO, R.; TOMITA, M.; ASAMI, N.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strenght of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. **Bifidus**, v.7, p. 139-147, 1994.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in foods. 1: their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto:University of Toronto Press, 1988. 436 p. ISBN 0-8020-2293-6.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technology**, v. 47, p. 126-134, 1993.

ISOLAURI, E.; JUNTNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKEE, P.; KOIVULA, T. A human lactobacillus strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**. v. 88, p. 90-97, 1991.

ITO, M.; OHNO, T.; TANAKA, R. A specific DNA probe for identification of *Bifidobacterium breve*. **Microbial Ecol. Health Dis.**, v. 5, p. 185-192, 1992.

IWANA, H.; MASUDA, H.; FUJISAWA, H.; MITSUOKA, T. Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. in commercial yogurts sold in **Europe**. **Bifidobacteria Microflora**, v. 12, p. 39-45, 1993.

JACOBSEN, C.N., NIELSEN, V.R., HAYFORD, A.E., MOLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., PAERREGAARD, A., SANDSTRÖM, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Enviromental Microbioogy**. v.65, n.11, p. 4949-5956, nov. 1999.

JAIN, A.K.; MURTY, M.N.; FLYNN, P.J. Data clustering: a review. **ACM Computing Surveys**. v.31, n. 3, p. 264-323, 1999.

JOHANSSON, M.; SANNI, A.; LÖNNER, C.; MOLIN, G. Phenotypically based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. **International journal od Food Microbiology**, v. 25, p. 159-168, 1995.

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

JOHANSSON, M.L.; QUEDNAU, M.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 155-159, 1995b.

JONES, C.D. & THOMAS, C.N. The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria. In: **LYONS. T.P.** (Ed.). *Biotechnology in the feed industry: proceedings of Alltech's thirth annual symposium*. Nicholasvile: Alltech Technical, p. 157-166, 1987.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian J. Dairy Technol.**, v. 52, n. 1, p. 28-35, 1997.

KANBE, M. Uses of intestinal lactic acid bacteria and health. In: *Functions of Fermented Milk*. eds. **Y. NAKAZAWA; A. HOSONO**. Elsevier Applied Science, London, pp. 289-303, 1992.

KANDLER, O. and WEISS, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}, p. 1209-1234. In: **SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G.** (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2. Baltimore: Williams & Wilkins.

KAUFMANN, P.; PFEFFERKORN, A.; TEUBER, M.; MEILE, L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-target probes by colony hybridization and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v 63, n^o 4, p.1268-1273, Apr. 1997.

KIM, H.S. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 23, p. 6-9, 1988.

KIM, H.S.; GILLILAND, S. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **J. Dairy Sci.**, v. 66, p. 959-966, 1983.

KLAENHAMMER, T.; ALERMANN, E.; ARIGONI, F.; BOLOTIN, A.; BREIDT, F.; BROADBENT, J.; CANO, R.; CHAILLOU, S.; DEUTSCHER, J.; GASSON, M.; GUCHTE, M.V. de.; GUZZO, J.; HARTKE, A.; HAWKINS, T.; HOLS, P.; HUTKINS, R.; KLEEREBEZEM. M.; KOK, J.; KUIPERS, O.; LUBBERS, M.; MAGUIN, E.; MCKAY, L.; MILLS, D.; NAUTA, A.; OVERBEEK, R.; PEL., H.; PRIDMORE, D.; SAIER, M.; SINDEREN, D.V.; SOROKIN, A.; STEELE, J.; O'SULLIVAN, D.; VOS, W. de.; WEIMER, B.; ZAGOREC, M.; SIEZEN, R. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 29-58, 2002.

KLAENHAMMER, T.R. and KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Int.J.Food Microbiol.** 50:45-57, 1999.

KLAENHAMMER, T.R.; KLEEMAN, E,C, Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 1461-1467, 1981.

KLAVER, F.A.M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherland Milk and Dairy Journal*, v. 47, p. 151-164, 1993.

KLEEMAN, E.G. & KLAENHAMMER, T.R. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v. 65, p. 2063-69, 1982.

KLEIN, G.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. *Lactobacillus*. In: **FRENEY, J.; RENAUD, F.; HANSEN, W.; BOLLET, C.** (Eds). *Manual de Bactériologie Clinique*. v. II, 2nd. Ed. Elsevier, Amsterdam, p. 885-898, 1994.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int. Journal Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KLEPPE,K.; OHTSUKA,E.; KLEPPE,R.; MOLINEUX,I.; KHORANA,H.G. - Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. **J. Mol. Biol.**, **56**: 341-61, 1971.

KNEIFEL, W.; PACHER, B. An X-Glu based agar medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt-related milk products. **Int. Dairy J.**, v. 3, p. 277-291, 1993.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, n.8-9, p. 295-306, 1998.

KOK, R.G.; WAAL, A. de; SCHUT, F.; WELLING, G.W.; WEENK, G.; HELLINGWERF, K.J. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3668-3672, 1996.

KOLARS, J.C.; LEVITT, M.D.; MOSTAFA-AOUJI, D.A.G.; SAVAIANO, D.A. Yogurt – an autodigesting source of lactose. **New England J. Med.**, v.310, p.1, 1984.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effects of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technology Biotechnol.**, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2000.

KURMANN, J.A. Starters for fermented milks: starters with selected intestinal bacteria. **Bulletin on the Intestinal Dairy Federation**, v. 227, p. 41-55, 1998.

KURMANN, J.A.; RASIC, J.L.J. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON R.K. (ed). Therapeutic Properties of Fermented Milk. London: Elsevier Applied Science, pp. 117-158, 1991.

LABAN, P.; FAVRE, C.; LARPENT, J.P. Lactobacilli isolated from French saucisson (taxonomic study). **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, Abteilung 1: Originale, Reihe B, 166: 105-111, 1978.

LANGENDIJK, P.S.; SCHUT, F.; JANSEN, G.J.; RAANGS, G.C.; KAMPHUIS, G.R.; WILKINSON, M.H.F.; WELLING, G.W. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3069-3075, 1995.

LANKAPUTHRA, E.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Milchwissenschaft**, v. 51, n. 8, p. 446-451, 1996.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Investigation of factors affecting viability of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in yoghurt. In: **24th International Dairy Congress Proceedings**, Melbourne, Australia, p. 292, 1994.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 30, n. 3, p. 2-7, 1995.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Food Australia**, v. 48, n. 3, p. 113-118, March 1996.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. **Milchwissenschaft.**, v. 51, n. 2, p. 65- 70, 1996b.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 30, n. 3, p. 2-7, 1995.

LAPIERRE, L. Growth of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented dairy products on different selective media. **Research paper**, Nestlé, 1990.

LAROIA, S.; MARTIN, J.H. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. **Cultured Dairy Products Journal**. v. 26, p. 13-21, November, 1991a.

LAROIA, S.; MARTIN, J.H. Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. **Cult. Dairy Prod. Journal**, v. 26, n. 5, p. 32-33, 1991b.

LARSEN, A.G.; VOGENSEN, F.K.; JOSEPHEN, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. **J. Appl. Bacteriol.** v.75, p.113-122, 1993.

LAUER, E.; KANDLER, O. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the strains of the genus *Bifidobacterium*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 4, p. 42-64, 1983.

LE BORGEOIS, P.; LAUTIER, M.; RITZENTHALER, P. Chromosome mapping in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 109-124, 1993.

LE JEUNE, C.; LONVAUD-FUNEL, A. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis* DNA analysis by restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Food Microbiology**, v. 11 , p. 195-202, 1994.

LE, M.G.; MOULTON, L.H.; HILL, C.; KRAMMER, A. Consumption of dairy produce and alcohol in a case-control study of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.77, p.633-636, 1986.

LEBLOND-BOURGET, N.; PHILIPPE, H.; MANGIN, I.; DECARIS, B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, n. 1, p. 102-111, 1996.

LEE, S.Y.; VEDAMUTHU, E.R.; WASHAM, C.J.; REINBOLD, G.W. Na agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. **J. Milk Food Technol.** v.37, p.272, 1974.

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

LEE, Y.K.; WONG, S-F. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk. In: **SALMINEN, S. VON WRIGHT, A.** eds. Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker Inc., 103-14, 1998.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. In: **Science**. v. 147, p. 747-748, 1965.

LIM, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J.; KIM, H.U. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 2108-2112, 1995.

LIN, M. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1460-1466, 1999.

LIU,P.Y. & WU,W.L. - Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **29**: 19-28, 1997.

LINDGREN, S.E.; DODROGOSZ, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 87, p. 149-164, 1990.

LLOYD, A.B.; CUMMING, R.B.; KENT, R.D. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p. 82-87, 1977.

LOGAM, N.A. **Bacterial systematics**. Blackwell Scientific Publications. 1994.

LORTAL, S.; HEIJENOORT, J. VAN; GRUBER, K.; SLEYTR, U.B.; VAN-HEIJENOORT, J. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, n. 3, p. 611-618, Mar. 1992.

LORTAL, S.; VALENCE, F.; BIZET, C.; MAUBOIS, J.L. Eletrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification. **Research Microbiology**, Paris, v. 148, n. 6, p. 461-474, July 1997.

LUCKEY, T.D. **Germfree Life and Gnotobiology**. New York: Academic Press, 1963.

LUI, A., SHU, Q., STEVENSON, B., GILL, H. Resistance to low pH, high bile and anti-pathogen properties of lactic acid bacterial strain MP006. In: **Conf. of the Internat. Commitee on Food Microbiol. & Higiene**. Chapter 12 Probiotcs, p. 838-843, 1999.

MCDONALD , L.C.; MCFEETERS, R.F.; DAESCHEL, M.A.; FLEMING, H.P. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactc acid bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 1382-1384, 1987.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69(suppl), p.1035S-1045S, 1999.

MAN, J.C.de; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 130-135, 1960.

MANACHINI, P.L.; PARINI, C. DNA restriction endonuclease cleavage patterns, DNA sequence similar and phenotypical characteristics in some strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus jugurti*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, p. 143-152, 1983.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 335-338, 1991.

MANGIN, I.; BOURGET, N.; SIMONET, J.M.; DECARIS, B. Selection of species-specific DNA probes which detect strain restriction polymorphism in four *Bifidobacterium* species. **Res. Microbiol.**, v. 146, p. 59-71, 1995.

MANZANARES, A. Bactérias benéficas al hombre. **La Alimentación Latino americana**, v. 218, p. 59-65, 1997.

MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1031-1037, 1997.

MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; POCHART, P.; CHASTANG, C.; DESJEUX, J.F.; RAMBAUD, J.C. Role of the microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. **J. Nutrition**. v.64, p.71, 1990a.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; RAMBAUD, J.C. Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. **World Rev. Nutr. Diet**. v.74, p.1, 1993a.

MARTEAU, P.; RAMBAUD, J.C. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 207-220, 1993.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; ZIDI, S.; GODEREL, I.; RAMBAUD, J.C. Survie dans l'intestine grêle de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium* spp. ingérés dans un lait fermenté: une base relationnelle pour l'utilisation des probiotiques chez l'homme. **Gastroentérol. Clin. Biol.**, v. 16, p. 25, 1992.

MARTIN, J.H. Technical considerations for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. **Bull. Int. Dairy Fed.**, n. 313, 49-51, 1996.

MARTIN, J.H.; CHOU, K.M. Selection of *Bifidobacterium* spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. I tolerance to pH of yogurt. **Cultured Dairy Prod. J.**, v. 27, n. 4, p. 21-26, 1992.

MARTINS, C.A. **Uma abordagem para pré-processamento de dados textuais em algoritmos de aprendizado**. Tese de Doutorado, ICMC-USP, 2003.

MATALON, M.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for differentiation of rods and cocci in yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 69, n. 10, p. 2569-2576, 1986.

MAYER, A.; REZESSY-SZABO, J.; BOGNAR, C.S.; BUJNA, E.; HOSCHKE, A. Isolation and some biological properties of human intestinal bifidobacteria. 1999.

MCCARTNEY, A.L.; WANG, W.; TANNOCK, G.W. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 62, p. 4608-4613, 1996.

MEDINA, L.M.; JORDONO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **J. Food Prot.**, v. 56, n. 8, p. 731-733, 1994.

MEDINA, L.M.; LOPEZ, M.C.; JORDANO, R. Considerations on the influence of bacterial populations kinetics on the shelf-life of bat-type products. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, v. 13, p. 177-181, 1995.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMANN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 57-64, 1997.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, p. 99-110, 2002.

MESSENS, W.; De VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.31-43, 2002.

METCHINIKOFF, E. **The Prolongation of Life**. GP Putnam's & Sons, New York, NY. 1908.

MITAL, B.K.; CARG, S.K. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews International**, v. 8, p. 347-389, 1992.

MITEVA, V.I.; ABADJIEVA, A.N.; STEFANOVA, T.T. M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 349-354, 1992.

MITEVA, V.; STEFANOVA, T.; BOUDAKOV, I. *et al.* Characterization of bacteriocins produced by strains from traditional Bulgarian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 21, p. 151-161, 1998 a.

MITEVA, V.; IVANOVA, I.; BOUDAKOV, I. *et al.* Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 603-614, 1998 b.

MITEVA, V.; BOUDAKOV, G.; IVANOVA-STOYANCHEVA, G.; MARINOVA, B.; MITEV, V.; MENGAUD, L. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 909-918, 2001.

MITSUOKA, T. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. **Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.**, v.210, p. 52-64, 1969.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **J. Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.

MITSUOKA, T. In: **Intestinal Bacteria and Health**, Tokyo: Harcourt Brace Jovanovich Japan, 1978, 208p.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr. Rev.**, v. 50, p. 438-346, 1992.

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

MODLER, H.W. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.23, p. 29-41, 1990.

MODLER, H.W.; MCKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors: review. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, v. 23, p. 29-41, 1990a.

MODLER, H.W.; MCKELLER, R.C.; GFF, H.D.; MACKIE, D.A. Using ice cream as a mechanism to incorporate bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. **Cultured Dairy Prod. J.**, v.25, n.3, p.4, 1990 b.

MODLER, H.W.; VILLA-GARCIA, L. The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. **Cult. Dairy Prod. J.**, v. 28, p. 4-8, 1993.

MOLIN, G.; JEPSSON, B.; AHRNÉ, S.; JOHANSSON, M.L.; NOBAEK, S.; STAHL, M.; BENGMARK, S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 314-323, 1993.

MORDARSKI, M. Detection of ribosomal nucleic acid homologies. In: GOODFELLOW, M. & MINNIKIN, D.E. **Chemical Methods in Bacterial Systematics**, p. 41-66. London: Academic Press, 1985.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.130-136, 1999.

MORI, K.; YAMAZAKI, K.; ISHIYAMA, T.; KATSUMATA, M.; KOBAYASHI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. **International Journal of Systemic Bacteriology**, v. 47, p. 54-57, 1997.

MORO, E. Über den *Bacillus acidophilus* n. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings (*Bacillus acidophilus* n. spec. A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infantis) **Jahrbuch für Kinderheilkunde**, 1900, 52:38-55 (in German).

MULLIS,K.; FALOONA,F.; SCHARF,S.; SAIKI,R.; HORN,G.; ERLICH,H. - Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, **51 Pt 1**: 263-73, 1986.

MUNOA, F.J. & PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(7):1715-1718, 1988.

MURTI, T.W.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M.J. Bacterial growth and volatile compounds in yoghurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* spp. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 153-157, 1992.

MUSTAPHA, A.; JIANG, T.; SAVAIANO, A. Improvement of lactose digestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport and acid tolerance of *Lb. acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1537-1545, 1997.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v. 38, n. 1, p. 13-126, 1999.

NAKAGAWA, T.; SHIMADA, M.; MUKAI, H.; ASADA, K.; KATO, I.; FUJINO, K.; SATO, T. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 637-640, 1994.

NAKAZAWA, Y.; HOSONO, A. (Eds.) **Functions of fermented milk. Challenges for the health sciences**. London, England: Elsevier Applied Science, 1992.

NEBRA, Y.; BLANCH, A.R. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5173-5176, 1999.

NING, W.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Biotype and ribotype diversity among *Lactobacillus* isolates from the mouse ileum. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 423-431, 1997.

NIGATU, A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 969-978, 2000.

NIGHSWONGER, B.D.; BRASHEARS, M.M.; GILLILAND, S.E. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 212-219, 1996.

NOH, D.O.; KIM, S.H.; GILLILAND, S.E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lb. acidophilus* ATCC 43121. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3107-3113, 1997.

NORTHFIELD, T.C. & MCCOLL, I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. **Gut**, v. 14, p. 513, 1973.

O'SULLIVAN, D.J., 1999. Methods for the analysis of intestinal microflora. In: **TANNOCK, G.W.** (Ed.), *Probiotics: a Critical Review*, cap.3. Wymondham (UK): Horizon Scientific Press.

O'SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K. Probiotic bacteria: myth or reality?. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 3, n. 12, p. 309-314, 1992.

OBERMANN, H.; LIBUDZISZ, Z. Fermented milks. In: **WOOD, B.J.B.** (ED.) Microbiology of Fermented Foods, p. 308-350, Blackie Academic & Professional, London, 1988.

OLIVE, D.M. & BEAN, P. - Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, **37**: 1661-9, 1999.

OLSON, C.F. Parallel algorithms for hierarchical clustering. **Parallel Computing**, v. 21, n.8, p. 1313-1325, 1995.

ONGOO, I.; FLEET, G.H. Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurts. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 48, p. 89-92, 1993.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**. v.9, p. 43-52, 1999.

PACHER, B.; KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **Int. Dairy Journal**. v. 6, p. 43-64, 1996.

PACK, A. **Protein-fingerprinting zur abgrenzung von spezies und stämmen aus der *Lactobacillus acidophilus*-gruppe**. Thesis Vet. Med., Free University of Berlin. 1997

PACK, A.; KLEIN, G.; REUTER, G. Zur taxonomischen einstufigung von *Lactobacillus acidophilus* 1 aus joghurtprodukten. In: **Proceeding of the 37th Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene**, Vol. II. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., GieBen, pp. 171-177, 1997

PARKER, R.B. Probiotics: the other half of the antibiotics story. **Animal Nutr. Hlth.**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PATIDAR, S.K.; PRAJAPATI, J.B.; DAVE, R.I. Standardization and evakuation of acidophilus lassi. **24th Inter. Dairy Congress**, Melbourne, Australia, sept. 18-22, 1994.

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO MD, M.G.; ARANHA, N.S.; PINTO, D.O.; MELLO SAMPAIO, J.L.; D'AVILA, F.A.; FERREIRA, A.L.; AMORIM ED, E.L.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. - Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **40**: 2420-4, 2002.

PENNA, F.J.; FILHO, L.A.P.; CALÇADO, A.C.; JUNIOR, H.R.; NICOLI, J.R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**. v.76, supl. 2, p.209-217, 2000.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**, n.9, p.4689-4693, Sept. 2002.

PÉREZ, P.F.; KOCIUBINSKI, G.; GÓMES, ZAVAGLIA, A.; BIBILONI, R.; MINNAARD, J.; DISALVO, E.A.; ANTONI, G.L. de Bifidobacteria from human origem: isolation, characterization and study of selected properties. 1999.

PETTERSSON, L.; GRAF, W.; SEVELIN, V. Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCDO 1748 in the human gastrointestinal tract. 2. Ability to pass the stomach and intestine in vivo. p. 127. In: Nutrition and the Intestinal Flora. **HALLGREN, B.** (Ed). Symp. Swed. Nutr. Found. XV, Almqvist and Wiksell, Uppsala, Sweden, 1985.

PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S. - Integration of molecular characterization of microorganisms in a

global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin. Infect. Dis.**, **32 Suppl 2**: S156-S167, 2001.

PFALLER,M.A.; HOLLIS,R.J.; SADER,H.S. - Molecular Biology - PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments. In: ISENBERG H.D. - **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. ASM Press ed. Washington, ASM Press, 1992. p.p.10.5.c.1-p.10.5.c.11.

PFALLER,M.A.; WENDT,C.; HOLLIS,R.J.; WENZEL,R.P.; FRITSCHER,S.J.; NEUBAUER,J.J.; HERWALDT,L.A. - Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **25**: 1-8, 1996.

PLAYNE, M.J. Probiotic Foods. **The Food Industry Conference Food Pro 93, International Food Processing Machinery and Technology Exhibition and Conference**. Sydney, 12-14 July, 1993.

POCHART, P.; DEWIT, O.; DESJEUX, J.F.; BOURLIOX, P. Viable starter culture β -galactosidase activity and lactose in duodenum after yoghurt ingestion in lactose-deficient humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 49, p. 828, 1989.

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. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 78-80, 1992.

POT, B.; HERTEL, C.; LUDWIG, W.; DESCHEEMAEKE, P.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K-H. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L.*

gasserii and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 513-517, 1993.

POT, B.; LUDWING, W.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K.-H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: **DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J.** (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 13-90, 1994.

POUPARD, J.A.; HUSSAIN, I.; NORRIS, R. Biology of the bifidobacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 136-165, 1973.

PRAJAPATI, J.B. & DAVE, R.I. Associative growth of *L. acidophilus* and *S. thermophilus* in buffalo milk. **24th Inter. Dairy Congress**, Melbourne, Australia, sept. 18-22, 1994.

PRASAD, J., GILL, H., SMART, J. & GOPAL, P.K. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **Int.dairy Journal** 8:993-1002, 1998.

PRIEST, F.; AUSTIN, B. **Modern Bacterial Taxonomy**. 2nd. ed. Chapman & Hall. 1993.

PRIEST, F.G.; BARBOUR, E.A. Numerical taxonomy of lactic acid bacteria and some related taxa. In: **GOODFELLOW, M.; JONES, D.; PRIEST, F.G.**, eds. *Computer Assisted Bacterial Systematics*. London, Academic Press, 1985, p. 137-164.

PRZYREMBEL, H. Consideration of possible legislation within existing regulatory frameworks. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 471S-475S, 2001.

RASIC, J. L. Cultured media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **Bull. Int. Dairy Fed.**, n. 252, p. 24-34, 1990.

RASIC, J.L.; KURMAN, J.A. **Bifidobacteria and Their Role**. Basel:Birkhäuser Verlag, 1983, 295p.

RASIC, J.L. Nutritive value of yogurt. **Cultured Dairy Prod.J.**, v.22, p. 6-9, 1987.

RASIC, J.L.; KURMAN, J.A. In: **Bifidobacteria and Their Roles**. Experientia Suppl. 39, ed. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, Boston, MA, Stuttgart, Germany, 1983, 295p.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PLUMKHACHOM, P. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from thai fermented foods. **ScienceAsia**. v.26, p.195-200, 2000.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks. **Biotechnol. Tech.**, v. 12, p. 819-822, 1998a.

REID, G. Testing the efficacy of probiotics. In: Probiotics a Critical Review, pp. 129-140. **G.W. TANNOCK**, ed. Horizon Scientific Press, Wymondham, 1999a

REIS, F.G., WOLF, B., LIMA, R.B., SANTOS, D.A., NEVES, C.S., SALVA, T.J.G., MORENO, I., LERAYER, A.L.S. Seleção de bactérias lácticas resistentes a sais biliares. **Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios**. p.102-107, 1998.

REQUE, E.F. **Isolamento, identificação e estudos fisiológicos da bactéria de ação probiótica (*Lactobacillus fermentum* LPB) para uso em frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química); Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1999.

REQUE, E.F.; PANDEY, A.; FRANCO, S.G.; SOCCOL, C.R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 303-307, 2000.

RESOLUÇÃO RDC 02 de 07/01/02. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticas isolado com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde, D.O.U. de 09/01/2002.

REUTER, G. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. **Bifidobacteria Microflora**, v. 9, p. 107, 1990.

REUTER, G. Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. *Bioscience and Microflora*, v. 16, p. 43-51, 1997a.

REUTER, G. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A**, v.191, p.486-507, 1963.

RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. **Nutrition and Food Science**, v. 4, p. 27-33, 1996.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J.G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 120, p. 291-296, 1994.

ROBINS-BROWNE, R.M.; PATH, F.F.; MYRON, M.; LEVINE, D.T.P.H. The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 34, p. 514, 1981.

ROBINSON, R.K. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. **Suid Afrikaanse Tydskrif Suiwelkunde**. v. 19, p. 25-27., 1987.

RODTONG, S.; TANNOCK, G.W. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3480-3484, 1993.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Food Sci. Technol.**,v.12, p.276-284, 2001.

ROISSART, H.; LUQUET, F.M. (Eds.) **Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques** (v. 2), pp. 144-146, France: Loriga, 1994.

ROMLING,U.; FIEDLER,B.; BOSSHAMMER,J.; GROTHUES,D.; GREIPEL,J.; VON DER,H.H.; TUMMLER,B. - Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **J. Infect. Dis.**, **170**: 1616-21, 1994.

ROMLING,U. & TUMMLER,B. - Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, **38**: 464-5, 2000.

ROSSI, D.A. **Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros.** 2001. 99f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

ROUSSEL, Y.; COLMIN, C.; SIMONET, J.M.; DECARIS, B. Strain characterisation, genome size and plasmid content in *Lb. acidophilus* group (Hansen and Mocquot). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 549-556, 1993.

ROY, D., & WARD, P. Rapid detection of *Bifidobacterium dentium* by enzymatic hydrolysis of β -glucuronide substrates. **J. Food Prot.**, v.55, p. 291-295, 1992.

ROY, D.; BERGER, J.L.; REUTER, G. Characterization of dairy-related *Bifidobacterium* spp. based on their β -galactosidase electrophoretic patterns. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 23, p. 55-70, 1994.

ROY, D.; DESJARDINS, M.L.; MONDOU, F. Selection of Bifidobacteria for use under cheese-making conditions. **Milchwisswenschaft**, v. 3, p. 139-142, 1995.

ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.191, p.17-24, 2000.

ROY, D.; WARD, P.; CHAMPAGNE, G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 11-29, 1996.

RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yoghurt bacteria. **Int. Dairy Journal.**, v. 6, p. 839-850, 1996.

RYBKA, S.;KAILASAPATHY, K. The survival of cultures bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 51-57, 1995.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATILLA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAAVEDRA, J.M. Probiotics and infectious diarrhea. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, p. S16-18, 2000.

SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

SADER,H.S.; HOLLIS,R.J.; PFALLER,M.A. - The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin. Lab Med.**, **15**: 407-31, 1995.

SADER,H.S.; PIGNATARI,A.C.; LEME,I.L.; BURATTINI,M.N.; TANCRESI,R.; HOLLIS,R.J.; JONES,R.N. - Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagn. Microbiol Infect. Dis.**, **17**: 13-8, 1993.

SAKATA, S.; KITAHARA, M.; SAKAMOTO, M.; HAYASHI, H.; FUKUYAMA, M.; BENNO, Y. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium longum*. JSEM Paper in Press, Published online 14 march 2002.

SALMINEN, S.; BOUSLEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CONTOR, L.; CUMMUNGS, J.; FRANCK, A.; GIBSON, G.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Gastrointestinal physiology and function: targets for functional food development. In: **Functional Food Science in Europe**, ILSI Europe, Brussels, 1997.

SALMINEN, S.; BOUSLEY, M.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. **Brit. J. Nutr.**, v. 80, p. 5147S-5171S, 1998c.

SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.A.; BENNO, Y.; GORBACH, S.L. Lactic acid bacteria in health and disease. In: **SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.**, Eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, p. 211-54, 1998a.

SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.A.; GORBACH, S. In: Lactic Acid Bacteria (**SALMINEN, S. and VON WRIGHT, A.**, EDS), p. 199-225, Marcel Dekker Inc., New York, 1993.

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

SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **J. Soc. Dairy Technol.**, v. 47, p. 58-60, 1994.

SANDERS, M.E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance of fluid milk products containing cultures. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 1819-1828, 1993.

SANDERS, M.E., WALKER, D.C., WALKER, K.M., AOYAMA, K., KLAENHAMMER, T.R. Performance of commercial culture in fluid milk applications. **J. Dairy Sci.**, v.79, p. 943-955, 1996.

SANDERS, M.E.; HUIS IN'T VELD, J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, p. 293-315, 1999.

SAREM-DAMERDJII, L.-O.; SAREM, F.; MARCHAL, L.; NICOLAS, J.-P. In vitro colonization ability of human colon mucosa by exogenous *Lactobacillus* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 133-137, 1995.

SAVAIANO, D.A.; ABDELHAK, A.; ABOUEL-ANOUAR, D.A.G.; SMITH, D.E.; LEVITT, M.D. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 40, p. 1219-1223, 1984.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SAXELIN, M.; PESSI, T.; SALMINEN, S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 25, p. 199-203, 1995.

SAXELIN, M.; RAUTELIN, H.; SALMINEN, S.; MAKELA, P.H. Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, v. 5, p. 331-335, 1996.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472AL. Page 1418-1434 In: **SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G.** (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986.

SCARDOVI, V. The Genus *Bifidobacterium*. In: The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, ed. **STARR, M.P.; STOLIP, H.; TRUPER, H.G.; BALOW, A.; SCHLEGEL, H.G.** New York: Springer Verlag, 1981.

SCARDOVI, V.; TROVATELLI, L.D.; BIAVATI, B.; ZANI, G. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* – for new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 29, p. 291-311, 1979.

SCHLEIFER, K.H.; EHRMANN, M.; BEIMFOHR, C.; BROCKMANN, E.; LUDWIG, W.; AMANN, R. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 5, p. 1081-1094, 1995.

SCHILLINGER, U. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: **BILLS, D.D.; KUNG, S.** (eds). Biotechnology and Food Safety. Butterworth-Heinemann, Boston, 1990, p. 55-74.

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 79-87, 1999.

SCHIOPPA, F.; PRETE, V.; DIET MONTANARO, D. Addition of *Lactobacillus* to yoghurt. **Riv. Soc. Ital. Scie. Aliment.**, v. 10, p. 247-252, 1981.

SCHLEIFER, K.H. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 46, p. 201-203, 1987.

SCHLEIFER, K.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 14, p. 461-467, 1995.

SCHREZENMEIR, J. & DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SELLARS, R.L. Acidophilus products. In: Therapeutic Properties of Fermented Milks. **ROBINSON, R.K.**, (ed.), p. 81-116, London: Elsevier Science Publishers Ltd, 1991.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*, p. 279-306. In: **B.J.B. WOOD & W.H. HOLZAPFEL** (Ed.) In: The Lactic Acid Bacteria v. 2, The genera of lactic acid bacteria. Cap. 8, Chapman & Hall, Glasgow, Scotland, 1995.

SHACKELFORD, L. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. **Nutrition and Cancer**, 5(3-4):159-164, 1983.

SHAH, N.P. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: a review. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 2, p. 71-76, 1997a.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J. of Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M.L.; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. **Int. Dairy J.**, v. 5, p. 515-521, 1995.

SHAHANI, K. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 11, n. 4, p. 14-17, 1976.

SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. p. 1653-1679. In: **STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G.** (ed). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin. 1981.

SHORTT, C. Host-microflora interface in health and disease. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 182-185, 1999b.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 411-417, 1999a.

SILBERT, S. **Tipagem molecular de bacilos gram negativos não fermentadores: comparação e aplicabilidade de diferentes técnicas**. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (Tese Doutor em Ciências), 97p., 2004.

SIMON, G.L.; GORBACH, S.L. Intestinal flora and gastrointestinal function. Page 1729 In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. v.2. 2nd ed. **L. R. JOHNSON**, ed. Raven Press, New York, NY, 1987.

SINGH, J.; KHANNA, A.; CHANDAR, H. Effect of incubation temperature and heat treatments of milk from milk of cow and buffalo on acid and flavour production by *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. **J. Food Prot.**, v.43, p. 399-400, 1980.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. **W.H. FREEMAN**, San Francisco 1973.

SNEATH, P.H.A.; KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.J.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARP, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, 1599p.

SOUTHERN, E.M. - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, **98**: 503-17, 1975.

SPECK, M.L. Enumeration of viable *Lactobacillus acidophilus* organisms in dairy products. **J. Food Prot.**, v. 41, n. 2, p. 135-137, 1978.

STACKEBRANDT, E. & TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochemie**, v. 70, p. 1025-1030, 1987.

STACKEBRANDT, E. & RAINEY, F.A. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In: **AKKERMANS, D.L.; VAN ELSAS, J.D.; de BRUIJIN, F.J.** (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*. P.1-17, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.

STAHL, M.; MOLIN, G. Classification of *Lactobacillus reuteri* by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n.1 p. 9-14, 1994.

STAHL, M.; MOLIN, G.; PERSSON, A.; AHRNÉ, S.; STAHL, S. Restriction endonuclease patterns and multi-variate analysis as a classification tool *Lactobacillus* spp. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.40, n. 2, p. 189-193, 1990.

STEFANO, DE R.; KAUFMANN, C.; SILVA, C.P.; TONON, A.; RIBEIRO, E.P. Desenvolvimento de um iogurte probiótico de baixa acidez. **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnol. Alimentos**, Fortaleza, p.43, 2000.

STILES, M.E.; HOLTZAPFEL, W.H. Review article. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 36, p. 1-29, 1997.

STRUELENS, M.J.; DE GHELDRE, Y.; DEPLANO, A. - Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **19**: 565-9, 1998.

STULL, T.L.; LIPUMA, J.J.; EDLIND, T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 280-286, 1988.

SUNG, J.Y.; SHAFFER, E.A.; COSTERTON, J.W. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens. Effects of hydrophobicity of the molecule and in the presence of phospholipids. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 2104, 1993.

SUSKOVIC, J.; BRKIC, B.; MATOSIC, S.; MARIC, V. *Lb. acidophilus* M92 as potential probiotic strain. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 430-435, 1997.

SUSKOVIC, J.; KOS, BLAZENKA; JADRANKA, G.; MATOSIC, S. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 39, n. 3, p. 227-235, 2001.

TAGG, J.R. & MCGIVEN, A.R. Assay System for bacteriocins. **Applied Microbiology**, Washington, 21 (5): 943, 1971.

TAILLIEZ, P.; QUÉNEE, P.; CHOPIN, A. Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: application de la RAPD à un groupe de lactobacilles. **Lait**, v. 76, p. 147-158, 1996.

TAMINE, A.Y.; MARSHALL, V.M.E. Microbiology and technology of fermented milks. In: Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. **LAW, B.A.**, (Ed.), pp.57-152, Blackie Academic & Professional, London, 1997.

TAMINE, A.Y.; MARSHALL, V.M.E.; ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Res.**, v. 62, p. 151-187, 1995.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. Fermented milk and their future trends. Part II. Technological aspects. **Journal of Dairy Research**, n. 55, p. 281-307, 1988.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogurt: Science and Technology**. Oxford:Pergamon Press, p. 276-374, 1985.

TANNOCK, G.W. Microecologia dos lactobacilos e bifidobactérias que habitam o aparelho digestivo: conhecimentos básicos para o êxito na pesquisa sobre probióticos. In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Nestlé Nutrition Services. Nestec Ltd. Vevey, Suíça, p.1-3, 1998 a.

TANNOCK, G. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 265-278, 1999b.

TANNOCK, G. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. In: **Probiotics a Critical Review**. p. 45-56, Horizon Scientific Press, Wymondham, 1999 a.

TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJÄRVI, S.; RODTONG, S.; MUNRO, J.H.K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4264-4267, 1999.

TEJADA-SIMON, M.V.; LEE, J.H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin responses to cholera toxin in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 649-660, 1999a.

TEJADA-SIMON, M.V.; PESTKA, J.J. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1435-1444, 1999b.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, 2002. (Disponível em: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; The Molecular Typing Working Group Of The Society For Healthcare Epidemiology Of America - How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, **18**: 426-39, 1997.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. - Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2233-2239, 1995.

TERAGUCHI, S.; UEHARA, M.; OGASA, K.; MITSUOKA, T. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Jpn. J. Bact.**, v.33, n.6, p. 753-761, 1978.

TERAHARA, M.; NISHIDE, S.; KANEKO, T. Preventive effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the oxidation of LDL. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 9, p. 1868-1873, 2000.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico**. 2001. 113f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **J. of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2288-2296, 2003.

THOMPSON,C.J.; DALY,C.; BARRETT,T.J.; GETCHELL,J.P.; GILCHRIST,M.J.; LOEFFELHOLZ,M.J. - Insertion element IS3-based PCR method for subtyping *Escherichia coli* O157:H7. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 1180-4, 1998.

THORMANN, C.E.; OSBORN, T.C. Use of RAPD & RFLP markers for gemplasm evaluation. In: **Applications of RAPD technology to plant breeding**. Minneapolis, 1992. p. 9-11.

TIMISJAVI, A.T.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 49-56, 1997.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An Overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 44, p. 163-191, 1994.

TOWNER, K.J.; COCKAYNE, A. **Molecular methods for microbial identification and typing**. Chapman & Hall, London, 1993.

TRAMER, J. Nisin in food preservation. **Chemistry and Industry**, v.12, n.3, p.446-450, 1966.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; MARTIN, P.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **Am. J. Clin. Nutr.** 73 (suppl), p.393S-8S, 2001.

TYNKKYNNEN, S.; SATOKARI, R.; SAARELA, M.; MATILA-SANDHOLM, T.; SAXELIN, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 3908-3914, 1999.

VALDEZ, G.F. de.; GIORI, G.S. de. Effectiveness of soy milk as food carrier for *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 320-322, 1993.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VARIANE, S.F. Caracterização molecular de linhagens de *Lactobacillus fermentum*. 1996. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1996.

VAN DER WAAJI, D.; VRIES, J.M.B.D.; LEKKERKERK-WEES, E.C.V.D. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **Journal of Hygiene**, v. 69, p. 405-411, 1971.

VAN'T VEER, P.; DEKKER, J.M.; LEMERS, J.W.J.; KOK, F.J.; SCHOUTEN, E.G.; BRANTS, H.A.M.; STURMANS, F.; HURMUS, R.J.J. Consumption of fermented milk products and breast cancer: a case control study in the Netherlands. **Cancer Res.**, v.49, p. 4020-4023, 1989.

VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbiol analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiol. Eco.**, v. 36, p. 113-121, 2001.

VERSALOVIC,J.; KOEUTH,T.; LUPSKI,J.R. - Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, **19**: 6823-31, 1991.

VIEDMA,D.; MARIN,M.; CERCENADO,E.; ALONSO,R.; RODRIGUEZ-CRÉIXEMS,M.; BOUZA,E. - Evidence of Nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection in a neonatology unit analyzed by three molecular typing methods. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **20**: 816-20, 1999.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGILIA, C.E. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1242-1247, 1996.

WARD, L.J.H. & TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 90-92, 1999.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res.**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WIJSMAN, M.R.; JOHANNA, L.P.; HEREIJGERS, M.; GROOTE, J.M.F.H. Selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 43, p. 395, 1989.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 1221-71, 1987.

WOOD, B.J.B. The **lactic acid bacteria in health and disease**, v. 1, pp. 151-339, Elsevier Appl. Sci., London, England, 1992.

YAESHIMA, T. Benefits of bifidobacteria to human health. **Bull. Int. Dairy Fed.**, n. 313, p. 36-42, 1996.

YAESHIMA, T.; FUJISAWA, T.; MITSUOKA, T. *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. **System. Appl. Microbiol.**, v.15, p.380-385, 1992.

YAESHIMA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMAURA, S. Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a micro plate hybridisation method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 303-313, 1996.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 917-922, Apr. 1994.

YAMAMOTO, T.; MOROTOMI, M.; TANAKA, R. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p.4076-4079, 1992.

YEUNG, P.S.M.; SANDERS, M.E.; KITTS, C.L.; CANO, R.; TONG, P.S. Species-specific identification of commercial probiotic strains. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 1039-1051, 2002.

YEUNG, P.S.M.; CANO, R.; TONG, P.S.; SANDERS, M.E. Comparison of API, 16S rDNA sequencing and fatty acid analysis as methods to speciate commercial probiotic bacteria. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 6, 1999.

ZAVAGLIA, G.A.; KOCIUBINSKI, G.; PEREZ, P.; DE ANTONI, G. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. **J. Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 865-873, 1998.

ZAVAGLIA, A.G.; URRAZA, P. de. ANTONI, G. de. Characterization of *Bifidobacterium longum* and *breve* strains by SDS-PAGE and ERIC-PCR., 2000
ZHONG, W.; MILLS, K.; BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H.; REID, G. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2418-2423, 1998.

ZIEMER, C.J. & GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, v.8, p. 473-479, 1998.

8 ANEXOS

ANEXO A –

FORMULAÇÃO E PREPARAÇÃO DE TODOS OS REAGENTES E MEIOS DE CULTURAS UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO DAS CULTURAS ISOLADAS DOS PRODUTOS E CULTURAS PADRÃO

MRS SUPLEMENTADO COM 0,05% CISTEINA-HCL

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Peptone	10,0g
Extrato de carne	8,0g
Extrato de levedura	4,0g
Glucose	20,0g
Sorbitano monooleato	1,0g
Fosfato dipotássio (K ₂ HPO ₄)	2,0g
Acetate de sódio 3 H ₂ O	5,0g
Citrate de amônia	2,0g
Sulfato de magnésio 7 H ₂ O	0,2g
Sulfato de manganês 4 H ₂ O	0,05g
Água destilada	1 litro

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH 6,2 e esterilizar a 121°C/15minutos. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo. Adiciona-se 0,05g de cisteína-HCl para para 100ml do meio.

MEIO APT E APT SEMI SÓLIDO SUPLEMENTADO COM 0,05% DE CISTEÍNA-HCl

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Tripticase (ou tripton ou peptone)	10,0g
Extrato de levedura	7,5g
Dextrose	10,0g
Fosfato dipotássio (K_2HPO_4)	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Citrato de sódio	5,0g
Carbonato de sódio	1,25g
Tiamina	0,001g
Tween 80	0,8g
Sulfato de magnésio	0,8g
Cloreto de manganês	0,14g
Sulfato ferroso	0,04g
Água destilada	1 litro

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH para 6,7 e esterilizar a 121°C por 15 minutos. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo. Para o APT semi sólido 0,3g de ágar devem ser adicionados ao meio e em seguida o frasco deve ser aquecido até dissolver todo o ágar. Distribuir em tubos de ensaio com o meio ainda quente e levar a esterilização conforme mencionado acima. Adiciona-se 0,05g de cisteína-HCl para para 100ml do meio.

MEIO LA (MODIFIED BIFIDUS BLOOD AGAR)

COMPOSIÇÃO DA BASE	QUANTIDADE
Solução A (nutrientes)	250ml
Solução B (agar 12,5%)	250ml
Solução C (sulfato de magnésio 1%)	20ml
Solução D (sulfato de manganês 1%)	5ml
Tween 80 (aquecido a 60°C)	1ml
Água destilada quente	Completar para 1 litro

pH final 6,8 a 25°C e esterilizar a 121°C por 30 minutos

Suplemento (sangue de carneiro desfibrilado)	50ml para 1 litro de base
--	---------------------------

Misturar os 250ml da solução A com os 250ml da Solução B (ágar). Adicionar os 20ml da solução C, os 5ml da solução D e 1ml de Tween 80 aquecido a 60°C. Completar o volume de mistura para 1 litro de água destilada quente, e aquecer até a fusão do ágar. Resfriar, ajustar o pH em 7,2 e esterilizar a 121°C por 30 minutos. Resfriar e verificar o pH, que deve ser 6,8 a 25°C. Fundir novamente, resfriar a 45-50°C, adicionar o sangue de carneiro e plaquear imediatamente.

Solução A

Peptona	10,0g
Extrato de carne	5,0g
Extrato de levedura	5,0g
Glicose	10,0g
Lactose	10,0g
Acetato de sódio	5,0g
Citrato de sódio	3,0g
Água destilada quente	250ml

Solução B

Ágar	20g
Água destilada quente	250ml

Solução C

Sulfato de magnésio heptahidratado	1,0g
Água destilada	100ml

Solução D

Sulfato de manganês tetrahidratado	1,0g
Água destilada	100ml

Sangue de Carneiro desfibrilado: manter a bolsa em geladeira e antes do uso, manter a temperatura ambiente por 3 horas, movimentando a bolsa periodicamente. Limpar o local da bolsa por onde será retirado o sangue com álcool 70% e, em seguida, com álcool iodado. Retirar o sangue com uma seringa estéril, agulha 25 x 7. Após a retirada do sangue, limpar o local da picada com álcool 70% e em seguida com álcool iodado. Recolocar a bolsa na geladeira e manter refrigerado por 1 a 2 meses.

BL AGAR (BLOOD GLUCOSE LIVER AGAR)

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Agar	15,0g
L-cysteine hydrochloride	0,5g
Glucose	10,0g
Lab-lemco	3,0g
Liver extract solution	150,0ml
Phytone (BBL)	3,0g
Proteose peptone nº 3 (Difco)	10,0g
Solution A	10,0ml
Solution B	5,0ml
Starch Soluble	0,5g
Tween 80	1,0g
Trypticase	5,0g
Água destilada	814,0ml
Yeast extract	5,0g

pH 7,2

Solution A	
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	25,0g
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	25,0g
Em 250ml de água destilada	

Solution B	
Ferrous sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5g
Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10,0g
Manganous sulphate ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,337g
Sodium chloride (NaCl)	0,5g
Em 250ml de água destilada	

Solution Liver Extract	
10g of liver powder are extracted with 170ml of distilled water for 1 hour at 50-60°C., boiled for 10 min and filtered.	

All constituents of the culture medium, except L-cysteine are dissolved in water, with the pH adjusted to 7.2, and sterilized at 120°C for 10 min. After cooling to 50°C, cysteine as a 5% sterile solution is added.

HHD (HOMO FERMENTATIVE HETERO FERMENTATIVE DIFFERENTIAL MEDIUM)

Frutose	1,0g
Fosfato potássio dihidratado	1,0g
Peptona tripticase	4,0g
Phytone petone	0,6g
Casimino acids	1,2g
Extrato de levedura	0,4g
Tween 80	0,4g
Ágar (pesar em separado dos demais ingredientes, quando for fazer mais de 400ml de meio)	8,0g
Água destilada	400ml

Homogeneizar e ajustar o pH para 6,8-7,0. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Resfriar o meio a 45-48°C e adicionar para cada 400ml de meio 8,0ml da solução bromocresol green e distribuir nas placas.

Solução de bromocresol green: pesar 0,1g de bromocresol green em 30ml de hidróxido de sódio 0,01N. Filtrar a solução utilizando papel de filtro quantitativo para a filtração rápida.

Solução de hidróxido de sódio 0,01N: pesar 0,04g de NaCl em 100ml de água destilada.

TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,0g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	1,15g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,2g
Água destilada	1 litro

Pesar todos os reagentes e homogeneizar, ajustar o pH para 7,3 e esterilizar a 115°C por 10 minutos ou filtrar a solução em membrana 0,2µ.

BIFIDOBACTERIUM MEDIUM 25 (BIM-25)

Base

Reinforced Clostridial Agar (RCA BBL 11564)	51g
Água	974ml

Suplementos esterilizados por filtração

Ácido nalidíxico (5ml da solução aquosa 0,4%)	0,02g
Sulfato de polimixina B (1ml da solução aquosa 0,85%)	0,0085g
Sulfato de kanamicina (10ml da solução aquosa 0,5%)	0,05g
Ácido iodoacético (5ml da solução aquosa 0,5%)	0,025g
Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (5ml da solução aquosa 0,5%)	0,025g

Preparação: Esterilizar o ágar RCA a 121°C/15min e resfriar a 45-50°C. Assépticamente, adicionar os suplementos previamente esterilizados por filtração.

ANEXO B –

FORMULAÇÃO E PREPARAÇÃO DE TODOS OS REAGENTES, CONCENTRAÇÕES E MEIO DE CULTURA UTILIZADOS PARA O TESTE DE F6PPK

CALDO TYP (TRYPTONE PHYTONE YEAST EXTRACT)

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Trypticase	10,0g
Phytone	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Glucose	5,0g
Tween 80	1,0ml
Cisteína-HCl	0,5g
K ₂ HPO ₄	2,0g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,5g
ZnSo ₄ . 7H ₂ O	0,25g
CaCl ₂	0,15g
FeCl ₃	0,03g
Água destilada	1000ml

Homogeneizar e ajustar o pH para 6,5, pipetar para um tubo 20,0ml do caldo e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

REAGENTES REQUERIDOS PARA A ANÁLISE:

-Tampão Fosfato 0,05M pH 6,5 suplementado com 500mg/L de Cloridrato de Cisteína (Cisteína-HCl)

Preparo: Pesar 6,8g de KH₂PO₄ e acrescentar 0,5g de cisteína-HCl, diluir para 1000ml em balão volumétrico e ajustar o pH.

-Solução de fluoreto de sódio (NaF) 6mg/ml mais iodoacetato de sódio 10mg/ml

Preparo: Pesar 0,06g/10ml de NaF. Pesar 0,1g/10ml de iodoacetato de sódio. Diluir em 10ml em balão volumétrico.

- *Solução aquosa de frutose-6-fosfato (80mg/ml)*

Preparo: Pesar 0,16g do reagente e diluir em 2ml de água peptonada.

Obs.: A solução deve ser preparada na hora da análise

- *Solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina 139mg/ml*

Preparo: Pesar 13,9g/ para 100ml de água destilada

- *Solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 15% (p/v)*

Preparo: Pesar 15g/100ml

- *Solução de ácido clorídrico 4N*

Preparo: Tomar o volume de 60,50ml de ácido e diluir para 1000ml de água destilada.

- *Solução de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 5% (p/v) em HCl 0,1M*

Preparo: Primeiramente deve-se preparar o HCl 0,01M com cuidado, tomando-se 1,51ml para 1000ml. Pesa-se 5g de cloreto férrico e dilui-se em 100ml do ácido.

ANEXO – C

QUADRO RELACIONANDO TODAS AS CULTURAS ISOLADAS, SUAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NO ISOLAMENTO E CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO FORNECIDO PELO FABRICANTE.

Quadro de relação de todas as culturas isoladas e seus fabricantes

Produto	Fabricante	Fabricação	Validade^{***}	Data análise	Data Isolamento
<i>Batavito – Leite fermentado aromatizado</i>	Batavo – Batávia S.A. Usina de Beneficiamento	11/05/01	10/06/01	28/05/01	05/06/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HHD	1mm, circular perfeita, verde com pequena borda branca, plana, sem brilho e sem viragem				
2 – HHD	1mm, circular perfeita, pequeno centro verde com borda branca, umbonate, brilhante e viragem amarelo				
3 – HHD*	1,5mm, circular estriada, transparente com ponto central, plana, sem brilho e sem viragem				
Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Yakult – leite fermentado</i>	Yakult SA Indústria e Comércio	09/05/01	09/06/01	07/06/01	11/06/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HHD	1 a 1,5mm, circular perfeita, centro verde pequeno com borda branca, brilhante, elevada, com viragem amarelo				

* Sem crescimento após o primeiro repique de isolamento

** Sem reativação à partir do leite congelado

*** Todas as análises foram feitas na data de validade do produto

Obs. Cepas em cinza foram perdidas

Continuação do quadro

Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Biofibras – bebida láctea fermentada com polpa de frutas e fibras</i>	Batavo – Batávia AS Usina de Beneficiamento (Carambeí – PR)	09/04/01 ^a 23/04/01b	24/05/01a 07/06/01b	24/05/01a 25/05/01b	29/05/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – LAa*	2mm, circular imperfeita, branca/ levemente marrom estriada, elevada, sem brilho e viragem marrom (chocolate)				
2 – LA ^a	1mm, circular perfeita, marrom, elevada, sem brilho e viragem marrom				
3 – LA ^a	4mm, circular perfeita, cinza, leitosa, plana, sem brilho e viragem marrom				
4 – LAb*	2mm, circular perfeita, marrom escura, plana, brilhante e viragem marrom				
5 – LA ^a	1mm, circular perfeita, marrom claro, levemente elevada, brilhante e viragem marrom				
6 – HHDa**	3 a 4mm, circular imperfeita, transparente, plana, sem brilho e viragem para o amarelo				
7 – HHD ^a	1 a 3mm, circular perfeita, centro verde grande borda transparente, plana, brilhante e viragem para o amarelo				
8 – BIMa*	1mm, circular perfeita, vinho (bordo), elevada, brilhante e sem viragem				
9 – BIM ^a	3mm, circular perfeita, vinho (bordo) com borda transparente, elevada, brilhante e sem viragem				
10 - BIM ^a	4mm, circular perfeita, centro vinho borda branca, elevada, brilhante e sem viragem				
Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Chamyto – Leite fermentado</i>	Nestlé Brasil Ltda	14/04/01	14/05/01	15/05/01	18/05/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HHD	Puntiforeme a 1mm, borda irregular, plana, transparente, fosca, sem viragem				
2 – HHD	1 a 3mm, circular perfeita com borda regular, plana, centro azul com borda branca, brilhante e sem viragem				

Continuação do quadro

Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Digimon – leite fermentado</i>	SA Fábrica de Produtos Alimentícios Vigor (São Paulo – SP)	03/05/01	03/06/01	22/05/01	25/05/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HDD	1mm, plana, circular perfeita, centro verde pequeno com borda branca, sem brilho e sem viragem				
2 – HDD	1mm, azul estriada irregular, plana, brilhante e sem viragem				
3 – HDD	2mm, centro azul borda branca estriada, irregular, plana, sem brilho e sem viragem				
4 – LA	2 a 3mm, centro marrom e borda branca, circular regular, elevada, com brilho e viragem chocolate				
5 – LA	3mm, centro marrom e borda cinza, circular regular, elevada, com brilho e viragem chocolate				
6 – LA	4mm, centro marrom borda cinza escura estriada, circular irregular, sem brilho e sem viragem				
7 – LA	1 a 2mm, centro marrom escuro e borda marrom claro, regular, plana, sem brilho e sem viragem				
8 – LA	2mm, marrom, circular regular, plana, sem brilho, sem viragem				
Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Fruty – iogurte com polpa de fruta</i>	Paulista – Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo	30/03/01	14/05/01	15/05/01	05/06/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 - HDD	2 a 2,5mm, circular perfeita com borda regular, centro verde grande com borda branca, umbonate, sem brilho e viragem para amarelo				
2 – HDD	1 a 2,5mm, circular perfeita com borda regular, umbonate, centro verde grande com borda branca, sem viragem e sem brilho				
3 – HDD*	1mm, circular estriada, verde com ponto central, plana, sem brilho e sem viragem				
4 –HDD*	1mm, circular perfeita, branca, ligeiramente elevada, brilhante, sem viragem				
5 – HDD*	1mm, circular estriada, plana, transparente, sem brilho e sem viragem				

Continuação do quadro

Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Neston – Bebida láctea com iogurte, cereal e frutas</i>	Nestlé Brasil Ltda	03/05/01	07/06/01	24/05/01 07/06/01 ^a	29/05/01 -
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HDD	2,0mm, circular perfeita, centro verde grande e pequena borda branca, sem brilho, umbonate e viragem amarela				
2 – HDD	1mm, circular irregular estriada, transparente, plana, sem brilho e sem viragem				
3 – LAa*	1mm, circular, cor creme com halo branco, gomosa, brilhante e sem viragem				
4 – LAa*	1,5mm, circular imperfeita, centro marrom grande com borda branca, gomosa e com viragem chocolate				
5 – LAa*	1mm, circular, marrom, plana, sem brilho e sem viragem				
6 – LAa*	Puntiforme, marrom, sem brilho e sem viragem				
Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Lactofós – Suplemento simbiótico à base de Lactobacillus e FOS</i>	Braskap Indústria e Comércio SA - Comercializado por Nutramed	Nov/00	Nov/01	18/05/01	22/05/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HDD	2mm, verde com pequena borda transparente, com brilho, circular perfeita, plana, viragem amarelo				
2 – HDD	3mm, centro verde com borda branca, sem brilho, circular perfeita, plana, viragem amarelo				
3 – HDD	2 a 4mm, centro verde com borda transparente estriada, sem brilho, plana e sem viragem				
4 – BIM	2 a 3mm, centro bordô com borda branca, com brilho, circular perfeita, plana, sem viragem				
5 – LA	2mm, centro marrom com borda branca, com brilho, circular perfeita, com elevação e viragem chocolate				
6 – LA	Puntiforme, marrom, sem brilho, sem elevação e sem viragem				
7 – LA	3mm, centro marrom borda cinza claro, sem brilho, circular perfeita, elevada e sem viragem				

Continuação do quadro

Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>Parmalat F – leite fermentado</i>	Parmalat Brasil S.A. Indústria de Alimentos	02/05/01	02/06/01	01/06/01	06/06/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HHD	1mm, circular perfeita, centro azul puntiforme, borda branca, umbonate, brilhante e viragem amarelo				
2 – HHD	2,5mm, ligeiramente elevada, circular estriada irregular, branca, brilhante e sem viragem				
Produto	Fabricante	Fabricação	Validade	Data análise	Data Isolamento
<i>LC 1 Active – Bebida láctea fermentada</i>	Nestlé Brasil Ltda (Araras-SP)	04/05/01 ^a 01/05/01 ^b	03/06/01 ^a 31/05/01 ^b	22/05/01 ^a 31/05/01 ^b	05/06/01
Tipo e Meio isolamento	Descrição da Colônia				
1 – HHD ^a	1mm, plana, transparente, borda circular estriada imperfeita, sem brilho e sem viragem				
2 – HHD ^a	1mm, plana, transparente com ponto central mais denso, circular perfeita com borda regular, sem brilho e sem viragem				
3 – LAa*	Puntiforme, ligeiramente elevada, marrom, brilhante e sem viragem				
4 – LAa*	3 a 5mm, plana, borda imperfeita estriada, sem brilho, marrom e sem viragem				
5 – HHD ^b	1mm, plana, circular perfeita, centro verde pequeno com borda branca, brilhante com viragem amarela				
6 – HHD ^b *	3 a 5mm, plana, circular estriada irregular, centro verde com borda transparente, sem brilho e com viragem amarela				
7 – LAb*	1mm, ligeiramente elevada, circular perfeita, marrom escura, com brilho e sem viragem				
8 – LA ^b	1mm, plana, circular perfeita, marrom claro, com brilho e sem viragem				
9 – LAb*	2 a 3 mm, plana, circular estriada imperfeita, sem brilho com viragem marrom				

* Sem crescimento após o primeiro repique de isolamento

** Sem reativação à partir do leite congelado

*** Todas as análises foram feitas na data de validade do produto

Obs. Cepas em cinza foram perdidas

ANEXO – D

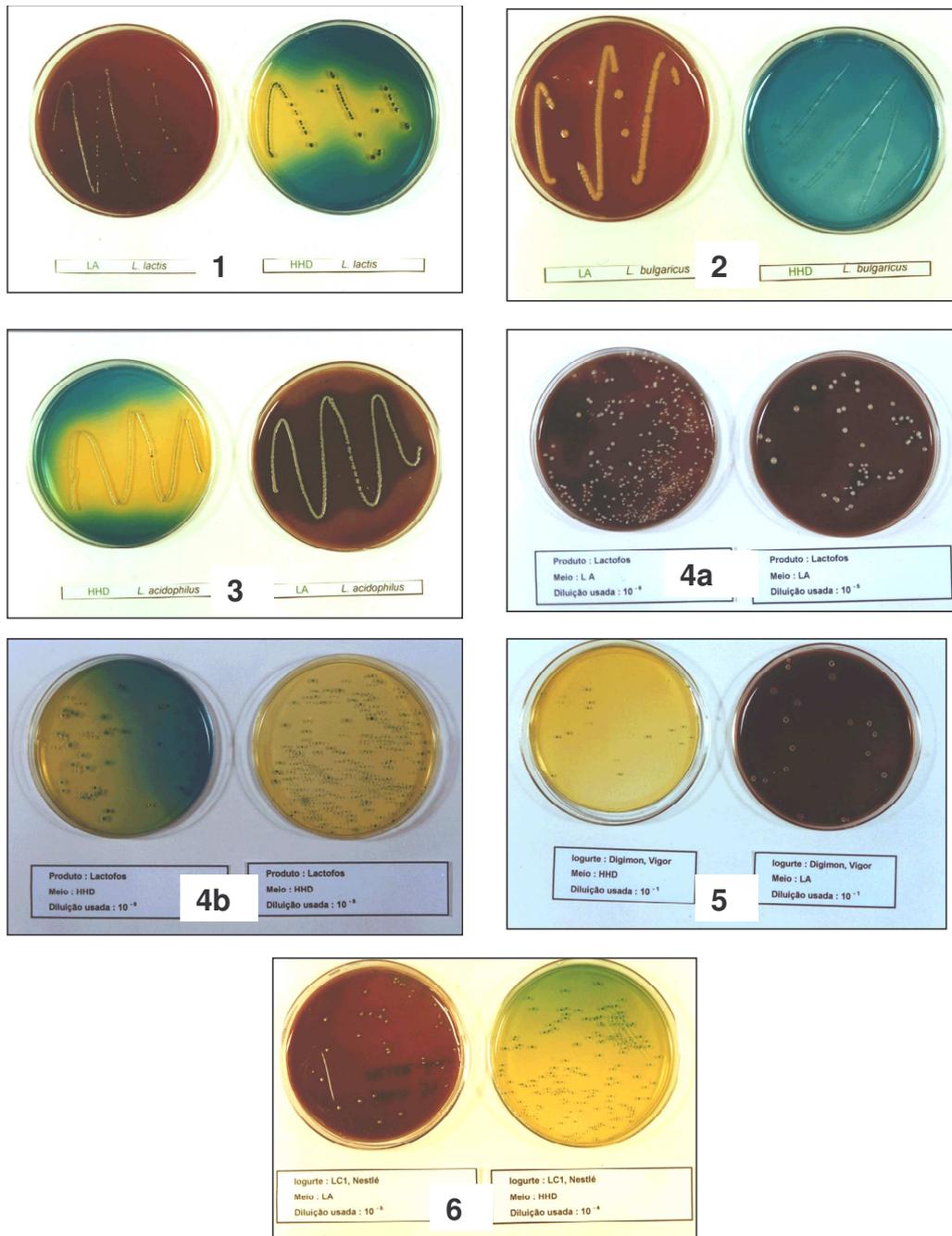


FIGURA 1. Fotos mostrando estrias e as unidades formadoras de colônias (UFC) de algumas culturas nos diferentes meios utilizados para o isolamento. (1) *Lactococcus lactis*, (2) *L. delbrueckii bulgaricus*, (3) *L. acidophilus*, (4) Colônias formadas dos produtos Lactofós (a e b); (5) Digimon e (6) LC1.

**ANEXO E – COLORAÇÃO DE GRAM OBTIDOS PARA AS
CULTURAS ISOLADAS DOS PRODUTOS**

