

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA DE  
BIFIDOBACTÉRIAS DE ORIGEM HUMANA COM ATIVIDADE POTENCIALMENTE  
PROBIÓTICA**

**JACIARA ZARPELLON MAZO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

**FLORIANÓPOLIS/SC**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA DE  
BIFIDOBACTÉRIAS DE ORIGEM HUMANA COM ATIVIDADE POTENCIALMENTE  
PROBIÓTICA**

Por

**Jaciara Zarpellon Mazo**

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna (UFSC)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio (UFSC)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Edna Amante (UFSC)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sandra Garcia (UEL)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eliana Furlong (FURG)

Coordenador:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Florianópolis, 15 de julho de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna, pela oportunidade, credibilidade e orientação para a realização deste trabalho.

Às Profas. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi e Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pelas sugestões, disponibilidade dos laboratórios e orientações.

À Profa. Dra. Sandra Garcia pela relatoria do trabalho e contribuições.

À minha mãe, Jurema, pelo seu exemplo de dedicação, luta e persistência para alcançar seus objetivos.

Ao Helton, por toda a paciência, companheirismo, amor e apoio dedicados.

Aos meus irmãos, Joel, Jones, Janice e Giovana, eternos apoiadores e incentivadores na realização deste trabalho.

Aos pais dos bebês, que gentilmente doaram a matéria prima para o início da pesquisa.

Às minhas amigas “anjos” Eunice C. Ilha, Caroline Tagliari e Andréia Zilio Dinon por todo o incentivo, dicas e auxílios nas análises.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Alimentar, pela agradável convivência, troca de idéias e estímulos, com carinho especial à Regina e ao Valdemar.

Aos colegas do curso de doutorado, pelos anos compartilhados, especialmente à amiga Sílvia Iop.

Ao Sérgio Souza, sempre atencioso e prestativo.

Às amigas, Clau, Cris, Tati e Gi por todo o carinho, afeto e pelas constantes palavras de otimismo e fé.

Aos ex-colegas do CRF/SC, que acreditaram no meu potencial e me incentivaram a seguir em frente, principalmente às pacientes amigas “Lulus” Nice, Carol, Flôr, Ju e Beta.

Ao amigo Washington Breves Filho (*in memorian*), um dos maiores incentivadores na realização do doutorado e meu crescimento profissional.

Ao Msc.Everaldo Amaral pelas análises estatísticas.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a aquisição dos materiais, reagentes e meios para a conclusão do projeto.

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

*A felicidade nos mantém doces.  
Dores nos mantém humanos.  
Quedas nos mantêm humildes.  
Sucessos nos mantêm brilhando.  
Provações nos mantêm fortes.  
Mas somente Deus nos mantêm  
prossequindo...*

(Autor desconhecido)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição e composição da microbiota intestinal humana	17
Tabela 2.	Espécies de Bifidobactérias isoladas de humanos e espécies usadas em produtos comerciais	20
Tabela 3.	Meios usados para o isolamento e enumeração de bifidobactérias	25
Tabela 4.	Composição do Meio de Cultivo Ágar RB	59
Tabela 5.	Composição do Meio de Cultivo Agar LP	59
Tabela 6.	Condições da PCR	61
Tabela 7.	Aditivos alimentares testados	67
Tabela 8.	Perfil de fermentação de carboidratos das cepas de <i>Bifidobacterium</i> isoladas após 72h de incubação, em Kit API CHL	77



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A	PCR para identificação do gênero <i>Bifidobacterium</i> usando primers Bif164/Bif662.....	71
Figura 1B	PCR para identificação do gênero <i>Bifidobacterium</i> usando primers Bif164/Bif662 (2-6) e primers PbiF1/PbiR2 (8-12).....	71
Figura 1C	ARDRA <i>AluI</i> após amplificação com Bif164/Bif662.....	72
Figura 1D	ARDRA <i>BamHI</i> após amplificação com Bif164/Bif662.....	72
Figura 2	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença da bile 0,3% (6 h) e na presença do suco gástrico simulado (1,5h e 3h).....	75
Figura 3	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17, I-20) na presença de ácido (24h) e em anaerobiose (72h), aerobiose (96h) e aerobiose (96h) seguida de anaerobiose (72h).....	84
Figura 4	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17, I-20) na presença de leite (24h), extrato de soja (24h), soro de leite (24h) e bactérias do iogurte (24h).....	90
Figura 5	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença de NaCl (0, 1 e 2%), a 24 h.....	91
Figura 6	Resistência das bifidobactérias isoladas I-6, I-17 e I-20 na presença dos açúcares sacarose (8%, 12%) e lactose (8%, 12%) a 24h.....	93
Figura 7	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos adoçantes acesulfame, aspartame, ciclamato e sacarina a 24h.....	94
Figura 8	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos corantes carmin, vermelho ponceau e cúrcuma a 24h.....	95
Figura 9	Resistência das bifidobactérias isoladas na presença dos flavorizantes de pêssego, morango e baunilha a 24h.....	96
Figura 10	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença das polpas de morango e pêssego a 24h.....	97
Figura 11	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos estabilizantes/espessantes goma xantana, goma guar, amido e amido modificado a 24h.....	99
Figura 12	Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos conservantes nisina, lisozima e sorbato de potássio.....	102

MAZO, J.Z. **Isolamento, caracterização e viabilidade tecnológica de bifidobactérias de origem humana com atividade potencialmente probiótica.** 2009. 129p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

## RESUMO

Probióticos são suplementos alimentares microbianos vivos que, quando ingeridos, apresentam efeitos benéficos para o hospedeiro, promovendo o equilíbrio microbiano intestinal. São comercializados de diferentes formas, sendo que a mais popular e acessível no Brasil são os leites fermentados. A seleção de cepas baseadas em atitudes tecnológicas é um aspecto crítico do desenvolvimento de um alimento funcional probiótico. As bactérias probióticas devem exibir resistência aos processos tecnológicos usados na preparação do veículo. O presente trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade tecnológica de bifidobactérias probióticas de origem fecal humana, a fim de auxiliar na escolha do veículo para a aplicação destas bactérias. As bifidobactérias foram isoladas de fezes de recém-nascidos, identificadas por meio de PCR e ARDRA e caracterizadas quanto a sua atividade probiótica, onde mostraram-se resistentes ao suco gástrico e à bile. Posteriormente foram testadas frente aos ingredientes (leite de vaca, extrato de soja e soro de queijo), na presença das bactérias do iogurte e de aditivos alimentares permitidos pela legislação vigente, verificando desta forma, o seu potencial para o uso na indústria de laticínios. As bifidobactérias isoladas apresentaram resistência a valores baixos de pH, mantendo-se viáveis e dentro dos padrões aceitáveis ( $10^6$  UFC/mL), bem como apresentaram crescimento ao serem expostas ao oxigênio, indicando serem aerotolerantes. Entre os aditivos pesquisados, foram observadas pequena atividade inibitória do crescimento somente quando avaliadas na presença de NaCl e dos conservantes nisina, lisozima e sorbato de potássio, com diminuição da viabilidade das cepas isoladas, porém estatisticamente, não houve diferença significativa entre o controle e as amostras avaliadas na presença dos aditivos.

**Palavras-chave:** probióticos, bifidobactérias, aditivos

MAZO, J.Z. **Isolation, characterization and technological viability of bifidobacteria of human activity with potentially probiotic.** 2009. 129p. Thesis (Doctor in Food Science). Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC.

## **ABSTRACT**

Probiotics are live microbial food supplements which when ingested, have beneficial effects for the host by stimulating the intestinal microbial balance. Are marketed in different ways, and the most popular and accessible in Brazil are the fermented milk. The selection of strains based on technology attitudes is a critical aspect of developing a probiotic functional food. The probiotic bacteria should exhibit resistance to technological processes used in the preparation of the vehicle. This study aimed to verify the technological feasibility of bifidobacteria probiotic of human fecal origin, to assist in the choice of vehicle for the application of these bacteria. The bifidobacteria were isolated from feces of newborn babies, identified by PCR and ARDRA and characterized its activity in probiotics, which were resistant to gastric juice and bile. Were subsequently tested against the ingredients (cow's milk, soymilk and cheese whey) in the presence of bacteria in yogurt and food additives permitted by law, verifying thus the potential for use in the dairy industry. The bifidobacteria isolated showed resistance to low pH values, remaining viable and within acceptable standards ( $10^6$  CFU / mL), and showed growth when exposed to oxygen, indicating they are aerotolerance. Among the additives studied, were some of the growth inhibitory activity only when measured in the presence of NaCl of preservatives nisin, lysozyme and potassium sorbate, with decreased viability of the strains.

**Key-words:** bifidobacteria, probiotic, additives

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Microbiota do trato gastrointestinal.....	15
2.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i> sp.....	19
2.2.1 Isolamento e identificação de <i>Bifidobacterium</i> sp.....	21
2.2.1.1 Técnicas de plaqueamento.....	21
2.2.1.2 Técnicas moleculares.....	26
2.3 Probióticos.....	34
2.3.1 Bifidobactérias probióticas.....	35
2.3.1.1 Resistência à bile.....	36
2.3.1.2 Resistência ao suco gástrico.....	37
2.3.1.3 Perfil de hidrofobicidade.....	38
2.3.1.4 Atividade antimicrobiana.....	39
2.3.2 Aspectos tecnológicos das cepas probióticas.....	40
2.3.2.1 Tolerância à acidez.....	41
2.3.2.2 Presença de oxigênio.....	42
2.3.2.3 Presença de ingredientes e aditivos alimentares.....	43
2.3.2.3.1 Ingredientes.....	43
2.3.2.3.1.1 Leite de vaca.....	44
2.3.2.3.1.2 Extrato de soja.....	46
2.3.2.3.1.3 Soro de queijo.....	48
2.3.2.3.1.4 Bactérias do iogurte.....	50
2.3.2.3.2 Aditivos alimentares.....	51
2.4 Prebióticos e simbióticos.....	53
2.5 Benefícios dos probióticos, prebióticos e simbióticos à saúde.....	54
2.5.1 Aumento da biodisponibilidade de minerais.....	54
2.5.2 Resistência aos patógenos.....	55
2.5.3 Redução de compostos cancerígenos.....	56

2.5.4 Efeito hipocolesterolêmico.....	56
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
3.1 Micro-organismos.....	58
3.2 Isolamento das bifidobactérias.....	58
3.3 Determinação da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase.....	59
3.4 Identificação molecular das bifidobactérias.....	60
3.4.1 Extração do DNA.....	60
3.4.2 PCR específica para o gênero <i>Bifidobacterium</i> sp.....	61
3.4.3 Eletroforese em gel de agarose.....	61
3.4.4 Análise da restrição do DNA amplificado.....	62
3.5 Verificação das características probióticas.....	62
3.5.1 Preparo do inóculo.....	62
3.5.2 Resistência à bile.....	62
3.5.3 Resistência ao suco gástrico.....	63
3.6 Perfil de fermentação dos carboidratos.....	63
3.7 Características tecnológicas das bifidobactérias.....	63
3.7.1 Tolerância à acidez.....	63
3.7.2 Exposição ao oxigênio.....	64
3.7.3 Influência de ingredientes e aditivos alimentares.....	64
3.7.3.1 Viabilidade de crescimento em leite.....	64
3.7.3.2 Viabilidade de crescimento em extrato de soja.....	65
3.7.3.3 Viabilidade de crescimento em soro de queijo.....	65
3.7.3.3.1 Obtenção do soro de queijo.....	65
3.7.3.3.2 Adição das bifidobactérias ao soro.....	65
3.7.3.4 Viabilidade de crescimento junto às bactérias do iogurte.....	66
3.7.3.5 Influência dos aditivos.....	66
3.7.3.6 Análise estatística.....	67
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
4.1 Isolamento das bifidobactérias.....	68
4.2 Determinação da presença da enzima F6PPK.....	69
4.3 Identificação molecular das bifidobactérias.....	70
4.4 Verificação das características probióticas.....	73
4.4.1 Resistência à bile.....	73

4.4.2 Resistência ao suco gástrico.....	74
4.5 Perfil de fermentação dos carboidratos.....	77
4.6 Características tecnológicas das bifidobactérias.....	80
4.6.1 Tolerância à acidez.....	80
4.6.2 Exposição ao oxigênio.....	82
4.6.3 Influência dos ingredientes e aditivos alimentares.....	84
4.6.3.1 Viabilidade de crescimento em leite.....	84
4.6.3.2 Viabilidade de crescimento em extrato de soja.....	86
4.6.3.3 Viabilidade de crescimento em soro de queijo.....	87
4.6.3.4 Viabilidade de crescimento junto às bactérias do iogurte.....	88
4.6.3.5 Influência dos aditivos.....	90
4.6.3.5.1 Sal.....	90
4.6.3.5.2 Açúcares.....	91
4.6.3.5.3 Adoçantes.....	93
4.6.3.5.4 Corantes naturais.....	94
4.6.3.5.5 Flavorizantes.....	96
4.6.3.5.6 Polpas.....	96
4.6.3.5.7 Espessantes/estabilizantes.....	97
4.6.3.5.8 Conservantes.....	99
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde já faz parte do nosso cotidiano, estando constantemente na mídia e no comportamento das pessoas, que procuram adotar hábitos e ter uma alimentação saudável. Com isso, a procura por produtos probióticos tende a aumentar, em função da contribuição para o equilíbrio da microbiota intestinal, do reforço às defesas naturais do organismo, e benefícios à saúde, impulsionando pesquisas por novas cepas e alimentos funcionais diversificados.

No Brasil, existem poucos dados a respeito da microbiota intestinal de recém nascidos e poucos relatos do isolamento de bifidobactérias que possam ser utilizadas como adjunto dietético com atividade probiótica. Teshima (2001), propôs que novas pesquisas fossem realizadas no sentido de se obter maiores informações sobre a microbiota intestinal da população nativa, para que os produtos funcionais de natureza probiótica a serem desenvolvidos sejam compatíveis com essa composição.

Atualmente, sabe-se que as propriedades probióticas estão ligadas não às espécies bacterianas propriamente ditas, mas a certas cepas dentro das espécies, sendo necessária uma seleção cuidadosa das cepas.

A utilização de bactérias bifidas nos alimentos constitui um problema, dadas as características anaeróbicas do gênero e a sensibilidade a ambientes ácidos, constituindo um desafio para o desenvolvimento de produtos nos quais *Bifidobacterium* deva permanecer viável durante a vida de prateleira (FERREIRA, 1996). O efeito dos aditivos alimentares no crescimento de iniciadores ácido-láticos e bactérias probióticas vem sendo muito pouco estudado e maiores informações são necessárias para sua aplicabilidade (VINDEROLA et al., 2002).

A adição de bactérias probióticas aos produtos lácteos exige uma série de cuidados. Entre as dificuldades podem ser citadas a pouca palatabilidade inferida

pelas bactérias probióticas e o longo tempo de fermentação. É importante lembrar que os produtos lácteos probióticos devem ser produzidos com as mesmas tecnologias empregadas no processamento dos produtos não probióticos (para não descaracterizá-los), e ainda assim, garantir a sua funcionalidade (FERREIRA, 1996).

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a viabilidade de utilização tecnológica de bifidobactérias potencialmente probióticas de origem fecal humana. Os objetivos específicos foram: isolar as cepas de bifidobactérias das amostras de fezes de recém-nascidos; comprovar, por meio de técnicas moleculares, o gênero das cepas de bifidobactérias isoladas; testar, *in vitro*, as cepas isoladas quanto à atividade potencialmente probiótica; analisar as cepas isoladas pelo perfil de fermentação de carboidratos e caracterizar as cepas probióticas quanto às propriedades tecnológicas: acidez, presença de oxigênio, ingredientes e aditivos.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Microbiota do trato gastrointestinal humano**

A comunidade microbiana que habita o trato gastrointestinal humano se caracteriza por uma população altamente densa, com ampla diversidade e interações complexas (TAPIA, 2002). Ela representa um ecossistema contendo cerca de 100 trilhões de bactérias e composta por mais de 400 diferentes espécies (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991).

O trato gastrointestinal é considerado um tubo anatômico especializado, dividido em várias regiões e se estende desde a boca até o ânus. O estômago e a porção proximal do intestino delgado contém um número menor de micro-organismos ( $10^3$  a  $10^5$  bactérias/g), devido ao pH baixo e ao fluxo rápido. Na região do íleo há diversidade microbiana e um número considerável de bactérias ( $10^8$ /g), já que parte do intestino é uma zona de transição até o intestino grosso. O cólon possui cerca de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  bactérias/g, pelo seu baixo potencial redox e elevada concentração de ácidos graxos de cadeia curta (TAPIA, 2002).

Segundo Mackie, Sghir e Gaskins (1999), a distribuição das bactérias endógenas no trato gastrointestinal ocorre em função das condições de cada região do trato, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, fatores químicos e físicos (Tabela 1).

Durante a etapa fetal o intestino se encontra estéril, ocorrendo a colonização no momento do parto, pela exposição aos micro-organismos de origem materna ou do meio externo onde nasce. A colonização bacteriana do neonato é influenciada pela idade gestacional, tipo de parto e constituintes da dieta (BALLABRIGA, 2001).

**Tabela 1** Distribuição e composição da microbiota intestinal humana

Sítio	Composição	UFC/mL ou g de conteúdo	pH	Potencial Oxi-redox (mV)
Estômago	<i>Lactobacillus</i> Leveduras <i>Streptococcus</i>	0-10 <sup>3</sup>	< 3,0	+150
Duodeno-jejuno	Similar ao estômago	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	6,0-7,0	-50
Jejuno-Íleo	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup>	6,0-7,0	-50 a -150
Íleo-Ceco	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup>	7,0-7,5	-150 a -200
Cólon	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Eubacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Veillonella</i>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>	7,0-7,5	-200 a -250

Fonte: Teshima (2001)

Crianças nascidas de parto normal são mais suscetíveis à colonização pela microbiota materna, devido à contaminação pelo canal vaginal, enquanto que crianças nascidas por operação cesariana são mais suscetíveis à colonização por bactérias do ambiente hospitalar (BEZIRTZOGLOU, 1997). Segundo Mitsuoka (1989) citado por Teshima (2001), crianças nascidas no mesmo hospital apresentam as mesmas cepas de bifidobactérias, que diferem das cepas de crianças nascidas em hospitais diversos, sendo que a contaminação pode ocorrer pelas mãos das

enfermeiras, dos médicos, pelos utensílios utilizados e demais aspectos do ambiente hospitalar.

O tipo de alimentação é um fator predominante na colonização e composição da microbiota de recém nascidos (BEZIRTZOGLU, 1997), sendo que as crianças amamentadas possuem predominância de bifidobactérias em relação às alimentadas com formulados. Essa predominância deve-se à presença de fatores bifidogênicos no leite materno, como os oligossacarídeos e glicoproteínas. O conteúdo de oligossacarídeos no leite materno demonstra variações individuais (condições genéticas) e temporais (fase de lactação) (COPPA, 1993), o que pode contribuir para retardar a colonização por bifidobactérias em algumas crianças, ou seja, a colonização de outros gêneros bacterianos pode sobrepor o número de bifidobactérias na microbiota intestinal nos primeiros meses de vida (WOLIN et al., 1998).

Mitsuoka (1982), citado por Teshima (2001) verificou a predominância de *B. breve* e *B. infantis* na microbiota de recém nascidos. Bezirtzoglou (1997), verificou a predominância de *B. bifidum* em recém nascidos mantidos exclusivamente com leite materno.

Embora várias teorias tentem explicar a predominância na colonização de alguns grupos bacterianos, entre os quais bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no recém nascido, ainda permanecem sem explicação de como o intestino de recém natos seleciona um número limitado de espécies bacterianas a partir da grande diversidade oferecida (TESHIMA, 2001).

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 micro-organismos pela produção de ácidos orgânicos, particularmente ácidos graxos de cadeia curta e pela produção de bacteriocinas. As

bactérias benéficas, como bifidobactérias, inibem a proliferação de bactérias nocivas e agem como protetoras do intestino grosso (FERREIRA, 1996).

*Bifidobacterium* sp domina a microbiota dos recém nascidos, porém sua proporção numérica diminui com o avanço da idade, acabando por estabilizar no terceiro lugar da lista dos gêneros mais abundantes, depois dos gêneros *Bacteroides* e *Eubacterium* (FINEGOLD et al., 1983 citados por GOMES; MALCATA, 2002).

## 2.2 Gênero *Bifidobacterium* sp

Bifidobactérias foram isoladas e descritas pela primeira vez por Tissier, em 1899, sendo denominada de *Bacillus bifidus communis*. O gênero *Bifidobacterium* sp foi proposto originalmente por Orla-Jensen, em 1924, mas somente em 1986 foi aceito e reconhecido como um gênero independente, na oitava edição do Manual Bergey's (TESHIMA, 2001).

As bifidobactérias são caracterizadas, em geral, como micro-organismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios, podendo apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados (HOLT et al., 1994).

Segundo Scardovi (1986), as bactérias bífidas crescem a uma temperatura ótima de 37°C a 41°C, mas não crescem em temperaturas abaixo de 25-28°C e acima de 43°-45°C. O pH ótimo de crescimento é de 6,0 a 7,0 e não ocorre crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8,0 a 8,5.

Devido a sua capacidade metabólica estão incluídas na família das bactérias ácido lácticas, mas são filogeneticamente distintas. O gênero *Bifidobacterium* inclui as espécies de *Gardnerella* e *Bifidobacterium* e pertencem à família *Actinomycetaceae* (KLIJN; MERCENIER; ARIGONI, 2005).

As bifidobactérias diferem das bactérias lácticas homo e heterofermentativas, pois a glicose é fermentada pela via frutose-6-fosfato, produzindo ácido acético e ácido láctico na forma L(+), na proporção molar de 3:2, respectivamente, e 5 moles de ATP, a partir de 2 moles de glicose. A presença de frutose-6-fosfato-fosfocetolase (F6PPK) distingue o gênero de outros do grupo. Esta enzima quebra a frutose-6-fosfato em acetil-fosfato e eritrose-4-fosfato, sendo o único gênero bacteriano de origem intestinal que possui essa via fermentativa conhecida como “via bífida” (MODLER; McKELLAR; YAGUCHI, 1990).

O perfil de fermentação de carboidratos constitui uma característica importante para auxiliar na identificação das espécies de bifidobactérias. Todas as espécies fermentam glicose, galactose, frutose e lactose, com exceção de *Bifidobacterium gallicum* que não utiliza lactose (BIAVATI et al., 1992, citado por TESHIMA, 2001).

Mais de 30 espécies já foram identificadas, sendo 11 isoladas de humanos (Tabela 2) (WARD; ROY, 2005). Tem-se como adições recentes *Bifidobacterium denticolens*, *B. inopinatum*, isoladas de cáries dentárias, e *B. psychraerophilum*, de origem intestinal de suínos. Com exceção das espécies isoladas de cáries dentárias, esgotos e insetos, a maioria das espécies são isoladas do trato gastrointestinal de mamíferos (KLIJN; MERCENIER; ARIGONI, 2005).

**Tabela 2** Espécies de bifidobactérias isoladas de humanos e espécies usadas em produtos comerciais

<b>Espécies isoladas de humanos</b>	<b>Espécies usadas em produtos comerciais</b>
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i> <sup>b</sup>
<i>B. angulatum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i> <sup>a</sup>
<i>B. catenulatum</i>	<i>B. lactis</i> <sup>b</sup>
<i>B. dentium</i>	<i>B. longum</i> <sup>a</sup>
<i>B. gallicum</i>	
<i>B. infantis</i> <sup>a</sup>	
<i>B. longum</i> <sup>a</sup>	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	
<i>B. sacardovi</i>	

<sup>a</sup> Unificação de *B. infantis* e *B. suis* como *B. longum* (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996)

<sup>b</sup> Reclassificação de *B. animalis* como *B. animalis* subsp. *animalis* e *B. lactis* como *B. animalis* subsp. *lactis* (MASCO et al., 2004, citado por WARD; ROY, 2005)

### 2.2.1 Isolamento e Identificação de *Bifidobacterium*

O isolamento de bifidobactérias despertou o interesse de pesquisadores de várias áreas, voltados para o conhecimento da microbiota intestinal humana e de animais, como indicador de contaminação fecal, sua presença em esgotos e na cavidade oral, bem como em produtos alimentícios probióticos, principalmente os lácteos.

Para detectar bifidobactérias diversos métodos podem ser empregados, tais como contagem em placas, técnicas moleculares (baseadas em DNA ou rRNA), fluorescentes ou imunológicas, bem como os métodos enzimáticos.

Os métodos clássicos, incluindo isolamento, identificação e enumeração de bifidobactérias são, em geral, trabalhosos e consomem tempo. Além disso, a identificação baseada em características fenotípicas nem sempre fornece resultados claros e confiáveis, bem como não permitem a diferenciação entre as espécies de *B. longum* e *B. infantis* (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996).

A identificação do gênero *Bifidobacterium* é convenientemente alcançada pela detecção da atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase; mas como *Gardnerella vaginalis* também expressa esta enzima, são necessários critérios adicionais para distinguir entre estas espécies (MULLIÉ et al., 2003).

#### 2.2.1.1 Técnicas de plaqueamento

O método de contagem em placas ainda é o mais utilizado para o isolamento das bifidobactérias. Portanto, o meio de cultura utilizado deve promover o crescimento seletivo das bifidobactérias, enquanto outros micro-organismos devem ser suprimidos (HARTEMINK et al., 1996).

A utilização de meios não seletivos e ricos nutricionalmente como MRS (*De Man, Rogosa and Sharp*) e TPY (*Trypticase Phytone Yeast*) para isolamento de

bifidobactérias, pode dificultar sua identificação, uma vez que várias espécies podem crescer nesses meios (BIAVATI et al., 1992, citado por TESHIMA, 2001).

Teraguchi et al (1978), citados por Laroia e Martin (1991), formularam um meio para enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos, os quais contêm misturas de bifidobactérias, lactobacilos e estreptococos. Este meio chamado NPNL (*Neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride*) apresenta ágar BL (*Blood-glucose-liver*) com sulfato de neomicina, sulfato de paromomicina, ácido nalídixico e cloreto de lítio. Muitos autores o consideram como meio de referência, pelo bom crescimento das bifidobactérias e possível inibição de cocos Gram positivos e Gram negativos, porém a seletividade deste meio tem como base o uso de antibióticos, e na microbiota intestinal de recém natos existe uma grande variação intraespecífica da resistência de bifidobactérias a antibióticos (LIM; HUH; BAEK., 1993; CHARTERIS et al., 1998).

Muñoa e Pares (1988), desenvolveram um meio para isolamento e enumeração de bifidobactérias em meios aquáticos naturais, para monitorar a qualidade bacteriológica da água. *Bifidobacterium* Iodoacetate Medium 25 (BIM-25) tem sua seletividade baseada na presença de iodoacetato e dos antibióticos ácido nalídixico, sulfato de polimixina B e sulfato de kanamicina. Nenhuma bactéria Gram negativa cresceu neste meio, sendo que as bifidobactérias testadas cresceram bem, com exceção de *B. adolescentis*, mostrando ser um bom meio para análises do gênero *Bifidobacterium* sp. como indicador de contaminação fecal.

Beerens (1990), verificou que muitos meios seletivos para bifidobactérias vinham sendo descritos, porém a maioria apresentava antibióticos na composição, mas nenhum era satisfatório para todas as espécies. Desta forma, desenvolveu um meio (*Beerens' Medium*) combinando o baixo pH (5,0) e ácido propiônico. Este meio mostrou-se eletivo e seletivo para todas as espécies de bifidobactérias, com aumento de crescimento, exceto *B. coryneforme*.

*Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar* (Ágar LP) é um meio simples e seguro para isolamento seletivo e enumeração de bifidobactérias de leites fermentados, segundo seus autores Lapierre, Undeland e Cox (1992), que apresenta cloreto de lítio e propionato de sódio para inibir o crescimento de outras bactérias ácido lácticas. Com exceção de uma cepa de *B. longum*, todas as demais bifidobactérias foram capazes de crescer neste meio.

Um meio *Blood-glucose-liver Agar* (Ágar BL-OG) contendo *Oxgall* e gentamicina foi formulado para enumeração seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados com lactobacilos e estreptococos. A recuperação das cepas bífidas testadas foi em torno de 90%, exceto para uma cepa de *B. longum*, e todas as demais bactérias ácido lácticas presentes foram inibidas (LIM; HUH; BAEK, 1995).

O meio “Bif” foi desenvolvido por Pacher e Kneifel (1996) para a detecção e enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados. A seletividade deste meio foi baseada na adição de soro de leite humano e dos antibióticos ácido nalidíxico, sulfato de paromomicina, aztreonam e netilmicina. Este meio foi utilizado para contagem em placas de diferentes produtos lácteos, apresentando um grande espectro de bifidobactérias, podendo ser usado em análises de rotina.

Hartemink et al. (1996), desenvolveram um novo meio para a detecção seletiva de bifidobactérias, o qual chamaram de *Raffinose-Bifidobacterium Medium* (RB). Foram utilizados rafinose como fonte de carboidratos, púrpura de bromocresol como indicador de pH, propionato de sódio e cloreto de lítio para estimular o crescimento e caseína como fonte de proteína. Todas as bifidobactérias de origem humana e de produtos lácteos cresceram bem neste meio, exceto algumas cepas de *Bifidobacterium longum* que não fermentam rafinose.

*Bifidobacterium Medium* (BFM), um meio livre de antibióticos foi estabelecido por Nebra e Blanch (1999) para a enumeração de bifidobactérias no meio ambiente ou em alimentos. A principal fonte de carbono utilizada foi lactulose, enquanto que



riboflavina e tiamina foram adicionadas como promotoras do crescimento. Ácido propiônico, cloreto de lítio e azul de metileno inibiram outras espécies bacterianas relacionadas, e o baixo pH inibiu o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*.

Vinderola e Reinheimer (1999) propuseram metodologias para a enumeração de bactérias probióticas (bifidobactérias e *Lactobacillus acidophilus*) na presença das bactérias do iogurte. Para a contagem de bifidobactérias utilizaram dois meios modificados: o BL-MRS, inicialmente proposto por Lim, Huh e Baek (1995), e o meio LP-MRS, sugerido por Lapierre, Undeland e Cox (1992), com substituição do ágar base por ágar MRS (*De Man, Rogosa and Sharp*).

Rada e Petr (2002), compararam os meios MTPY (*Trypticase Phytone Yeast Mupirocin Medium*) e MTPYC (*Trypticase Phytone Yeast Mupirocin Medium Colistin*), por eles desenvolvidos para enumerar bifidobactérias de amostras intestinais e fecais. Os compostos seletivos utilizados foram o antibiótico mupirocina em ambos os meios, e no meio MTPYC ainda são utilizados ácido acético glacial e outro antibiótico, a colistina (polimixina E). Ágar MTPY mostrou-se seletivo para todas as amostras testadas, com exceção das fezes de suínos. Ágar MTPYC apresentou 100% de seletividade para bifidobactérias.

Metodologia de plaqueamento seletivo para enumeração de culturas mistas presentes no leite fermentado foi sugerida por Tabasco et al. (2007). Os meios utilizados foram livres de antibióticos, sendo que a enumeração de *Bifidobacterium lactis* foi obtida pelo meio MRS-rafinose contendo 0,05% de cloreto de lítio.

Outros meios seletivos e não seletivos foram descritos para a enumeração de bifidobactérias, como os mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3** Meios usados para o isolamento e a enumeração de bifidobactérias

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Base da Seletividade</b>	<b>Usos</b>	<b>Referência</b>
AL Ágar	Lactose, acetilglicosamina	Fezes	Yazawa, Nakajima e Tamura (1984)
AMC Ágar	Ácido nalidíxico, polimixina B, sulfato de kanamicina, ácido iodoacético, TTC, cloreto de lítio, propionato	<i>B. longum</i>	Arroyo, Cotton e Martin (1995)
BBM Ágar	Ácido nalidíxico, rifampicina, rafinose	Fezes	Cole e Fuller (1989)
BiBI Ágar	Anilina azul, sangue	fezes, produtos farmacêuticos	Rasic (1990)
BS Agar	Cloreto de lítio, neomicina, paromomicina, propionato	Fezes	Rasic (1990)
CB Agar	Azul da China	Fezes	Mevisse-Verhage et al. (1987)
GL Agar	Galactose, cloreto de lítio	produtos lácteos	Iwana et al. (1993)
LCL Ágar	Lactose, infusão de fígado	fezes	Rasic (1990)
MPN Ágar	Lactose, ácido nalidíxico	fezes	Tanaka e Mutai (1980)
MRS-LP Ágar	Propionato, cloreto de lítio	produtos lácteos	Gomes et al. (1995)
RCM (modificado)	pH baixo	produtos lácteos	Rasic (1990)
RCM + corante	Azul de metileno	produtos lácteos	Rasic (1990)
Rogosa	pH baixo	produtos lácteos, fezes	Rasic (1990)
Rogosa Modificado	Neomicina, propionato paromomicina, cloreto de lítio	produtos lácteos	Rasic (1990)
Rogosa-N	pH baixo, ácido nalidíxico	fezes	Rasic (1990)
TCPY Ágar	Suco de tomate	fezes	Rasic (1990)
TCPY Agar Modificado	Suco de tomate, azida	fezes	Rasic (1990)
TCPY Agar Modificado	Suco de tomate, ácido sórbico	fezes	Rasic (1990)
TOS Ágar	TOS	fezes, produtos lácteos	Sonoike, Mada e Mutai (1986)
TOS Agar Modificado	TOS, ácido nalidíxico, neomicina, paromomicina	produtos lácteos	Wijsman, Hereijgers e De Groote (1989)
TPYd Ágar	Dicloxacilina	produtos lácteos	Sozzi et al. (1990)

Continuação da Tabela 3

TTC Ágar	TTC	contaminação fecal	Gyllenberg e Niemela (1957)
VF Agar Modificado	Cloreto de lítio, propionato, neomicina, lauril sulfato de sódio	produtos lácteos	Calicchia et al. (1993)
YN-6	Lactose, ácido nalíxico, neomicina, verde de bromocresol	Fezes, esgotos	Resnick e Levin (1981)

Fonte: modificado de Hartemink et al. (1996)

### 2.2.1.2 Técnicas Moleculares

Os primeiros métodos de identificação molecular desenvolvidos foram hibridização DNA-DNA, análise da seqüência de 16S rDNA, hibridização com sonda específica e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Baseados na composição em ácidos nucléicos, normalmente são usados em associação com a identificação microbiológica convencional (WARD; ROY, 2005).

A hibridização DNA-DNA utiliza membranas filtrantes para a fixação do DNA e radioisótopos para a detecção (CROCIANI et al., 1996), ou microplacas e fotobiotina (SATOKARI et al., 2001; YAESHIMA et al., 1996) para verificar a homologia entre as cepas isoladas e a cepa padrão. Se a porcentagem de homologia for maior que 70% entre as isoladas e a padrão, e o critério fenotípico corresponder ao resultado, estas cepas podem ser agrupadas na mesma espécie (HERREMAN; ASSELIN; NOVEL, 1994, citados por WARD; ROY, 2005). *B. longum* e *B. infantis* apresentam similaridade próxima a 70% (HERREMAN; ASSELIN; NOVEL, 1994, citados por WARD; ROY, 2005) e em *B. animalis* e *B. lactis* é maior que 80% (MATSUKI; WATANABE; TANAKA, 2003).

Para a hibridização com uma sonda específica, o ácido nucléico é fixado em um suporte sólido, nitrocelulose ou membrana de nylon, por *dot blot* ou hibridização da colônia (ITO; OHNO; TANAKA, 1992; KAUFMANN et. al., 1997). A sonda pode ser um simples oligonucleotídeo ou fragmento de DNA clonado e caracterizado, marcado com biotina ou digoxigenina para produzir uma reação colorimétrica

(KAUFMANN et al., 1997) ou radiomarcado (ITO; OHNO; TANAKA, 1992). Com as sondas radiomarcadas a quantidade de híbridos formados é determinada por autoradiografia.

O gene 16S rRNA é considerado universalmente como presente em todas as bactérias e mostra um alto grau de preservação da seqüência. A verificação da homologia por este gene demonstra alguns resultados interessantes para análises filogenéticas do gênero *Bifidobacterium* (FROTHINGHAM; DUNCAN; WILSON, 1993, citados por WARD; ROY, 2005). As similaridades são muito altas em algumas espécies, como *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* (similaridade de 99,5%), *B. longum* e *B. infantis* (similaridade 99,1%), *B. lactis* e *B. animalis* (similaridade de 99%) (MEILE et al., 1997; MIYAKE et al., 1998). Recentemente, a unificação de *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis* dividiu-as em três biotipos e a separação de *B. lactis* de *B. animalis* em níveis de subespécies foram propostas (VENTURA; ZINK, 2002; MASCO et al., 2004, citados por WARD; ROY, 2005; SAKATA et al., 2002, citados por WARD; ROY, 2005).

*Fluorescence in-situ hybridization* (FISH) utilizando uma lâmina de microscópio também é usada para detectar e determinar a população de *Bifidobacterium* spp. em diferentes amostras (LANGENDIJK et al., 1995). Algumas sondas gênero específicas e espécie-específicas para *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. animalis* e *B. longum* foram propostas (CHARTERIS et al., 1997; ITO; OHNO; TANAKA, 1992; YAMAMOTO; MOROTOMI; TANAKA, 1992).

*Ribotyping* ou *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizada na identificação de polimorfismos que determinam a alteração do padrão de clivagem obtido a partir de uma determinada região do DNA, onde a sonda é a própria região potencialmente polimórfica, contendo 16S ou 23S ou ambos 16S e 23S DNA complementar. Antes da hibridização o DNA é digerido com *Bam*HI, *Eco*RV, *Pvu*II ou *Nar*I (MANGIN et al., 1994) e transferido em uma membrana por *Southern blot*. Este método possibilitou a diferenciação entre as espécies de *B. adolescentis*, *B.*

*animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. longum* (McCARTNEY; TANNOCK, 1995).

*Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) é freqüentemente usada para caracterizar bactérias probióticas. Com esta técnica, o genoma inteiro extraído de um cultivo bacteriano é usado para gerar o perfil de DNA após a amplificação da PCR com iniciadores ao acaso (VINCENT et al., 1998). Estes iniciadores são freqüentemente dez nucleotídeos e somente um é usado em cada reação. Os diferentes tamanhos dos *amplicons* foram visualizados em luz UV após eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio. Os perfis da RAPD podem ser combinados e analisados com *software* apropriado. Vincent et al. (1998) usaram grupos de iniciadores OPA-02, OPA-18, OPL-07, OPL-16 E OPM-05 em diferentes grupos de *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* e *B. animalis*. Cepas de *B. infantis* foram agrupadas em um subgrupo de *B. longum*. Os resultados similares foram obtidos por Sakata et al. (2002) citado por Ward e Roy (2005), com *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis*. A comparação de perfis da RAPD podem também ser usadas para recuperar uma cepa específica em amostras diferentes. As variações entre as espécies e as cepas podem ser identificadas com o número e o tamanho dos fragmentos de DNA. Às vezes a reprodutibilidade desta técnica é baixa e são necessárias a utilização de condições de controle e manuseio meticulosos (WARD; ROY, 2005).

DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) é baseada no fenômeno descontínuo de dissociação, possibilitando a resolução de fragmentos do DNA com a substituição de um único nucleotídeo. As principais dificuldades com a DGGE são para escolher o tempo de corrida adequado e as condições do gel para realizar uma ótima separação. A amplificação PCR das regiões V2-V3 do 16S rDNA ou fragmento de DNA transaldolase seguido por DGGE permitiu a separação de *B. animalis*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* e *B. breve* (FASOLI et al., 2003; REQUENA et al., 2002). Este método é popular na avaliação da composição bacteriana em amostras fecais (ROY; SIROIS, 2000;

SATOKARI et al., 2001) e pode ser um método interessante e rápido para a triagem das bifidobactérias componentes de produtos probióticos (FASOLI et al., 2003).

Boa reprodutibilidade e eficiente diferenciação entre as cepas de *Bifidobacterium* é observada no método de eletroforese *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Comparada a outras técnicas moleculares, a PFGE requer mais tempo e a extração do DNA genômico em agarose. Esta extração permite ter o DNA intacto antes da digestão. Poucas enzimas de restrição podem ser selecionadas para obter um perfil de DNA contendo de 10 a 20 fragmentos. Mudanças periódicas na orientação do campo elétrico durante migração de 18h a 24h permite a separação de grandes fragmentos de DNA. *Xba*I, *Spe*I, *Dra*I e *Asc*I são quatro enzimas que geram padrões seletivos para as cepas de *Bifidobacterium* (BOURGET; SIMONET; DECARIS, 1993; O'RIORDAN; FITZGERALD, 1997; PRASAD et al., 1998; ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996). Perfis PFGE foram obtidos com algumas cepas comerciais (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996) e cepas padrões de *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. cateculatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. lactis* e *B. breve* (BOURGET; SIMONET; DECARIS, 1993; O'RIORDAN; FITZGERALD, 1997; PRASAD et al., 1998; ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996). Estes perfis são geralmente diferentes entre as diversas cepas. Contudo, *B. animalis* ATCC 25527 e ATCC 27674 apresentam o mesmo molde após a digestão com *Xba*I e *Spe*I (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996), e da mesma forma as cepas de *B. animalis* ATCC 27536 e *B. lactis* DSM 10140. A maioria das cepas de *Bifidobacterium* isoladas de preparações comerciais européias não puderam ser distintas de *B. animalis* ATCC 27536, previamente isolado de fezes de galinha (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996). PFGE pode também ser usada para estimar o tamanho do genoma. Algumas grandes variações foram observadas em tamanhos de genomas de algumas cepas pertencentes a mesma espécie. Por exemplo, com *B. bifidum* o tamanho estimado após a digestão com *Xba*I foram entre 1,6 e 2,2 Mb (ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996). O tamanho estimado do genoma de *Bifidobacterium* ficou entre 1.1 e 2.2 Mb (BOURGET; SIMONET; DECARIS, 1993; O'RIORDAN; FITZGERALD, 1997; ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de operação rápida, exata, sensível e fácil. Permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, usando dois iniciadores (*primers*) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. A especificidade desta técnica está diretamente associada com a seleção dos iniciadores e a temperatura de anelamento deles. A amplificação de DNA de bifidobactérias pode ser feita diretamente de uma colônia ou uma amostra fecal, sem necessidade de cultivo prévio (KULLEN et al., 1997; MULLIÉ et al., 2003). Uma vantagem desta técnica na detecção de *Bifidobacterium* é que não requer condições anaeróbicas, como o método de cultivo clássico (MATSUKI; WATANABE; TANAKA, 2003). Alguns pares de iniciadores baseados em 16S rDNA foram selecionados para a detecção do gênero *Bifidobacterium* e para as principais espécies humanas (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, grupo *B. catenulatum*, *B. dentium* e *B. gallicum*) (MATSUKI et al., 1998; MATSUKI et al, 1999; ROY; WARD; CHAMPAGNE, 1996; SILVI et al., 2003; WANG; CAO; CERNIGLIA, 1996) e cepas usadas em produtos comerciais (*B. lactis* e *B. animalis*) (PRASAD et al., 1998; VENTURA; RENIERO; ZINK, 2001). Kok et al (1996), visando detectar cepas de bifidobactérias e identificá-las, desenvolveram três tipos de iniciadores, sendo eles iniciadores gerais Bif16S3, Bif16S4 e Bif23S1; iniciadores específicos para gênero *Bifidobacterium* Bif 164 e Bif 662 e iniciadores específicos para as cepas LW420A, LW420C e LW420D. Brigidi et al (2003), utilizaram a técnica da PCR para identificar e enumerar cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis* Y1 e *Bifidobacterium breve* Y8 em amostras fecais após a administração de uma preparação farmacêutica (VSL-3) ou iogurte, sendo que a amplificação do DNA foi obtida por meio de iniciadores específicos para cepas, InfY-BV.L/R e BreY-BV.L/R.

*Multiplex* PCR é similar à PCR convencional. Muitos pares de iniciadores são usados na mesma reação e ao mesmo tempo, para a detecção de muitos gêneros bacterianos ou de diferentes espécies. Outras vantagens desta técnica são a redução do número de reações da PCR e a redução do tempo gasto. Neste método algumas recomendações são importantes: 1) a temperatura do anelamento dos iniciadores deve ser a mesma para todos os pares; 2) os iniciadores usados não

podem gerar nenhuma reação cruzada; 3) tamanhos diferentes dos produtos da PCR são necessários para possibilitar a distinção entre as diferentes espécies ou bactérias e 4) esta técnica precisa de uma grande quantidade de *Taq* polimerase (MATSUKI; WATANABE; TANAKA, 2003). Diferentes PCR *multiplex* têm sido designados para detecção simultânea de: 1) *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. adolescentis* (DONG; CHENG; JIAN, 2000); 2) *B. bifidum*, *B. breve* e *B. infantis*; 3) *B. angulatum*, *B. cateculatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium* e *B. longum* e 4) *B. adolescentis*, *B. scardovii* e *B. gallicum* (MULLIÉ et al., 2003).

Seqüências de genes específicos podem ser usadas para identificação e caracterização de *Bifidobacterium*. Alguns genes diferentes de 16S rRNA são usados para a diferenciação de bifidobactérias. Estes genes são: gene da L-lactato desidrogenase (*ldh*), gene *recA*, gene da proteína de choque térmico 60 (HSP60), gene da piruvato quinase (PK) (KULLEN; BRADY; O'SULLIVAN, 1997; ROY; SIROIS, 2000; VAUGIEN; PREVOTS; ROQUES, 2002). Antes do sequenciamento, uma parte do gene é selecionada e amplificada por PCR. O produto da PCR é sequenciado, analisado e comparado com as outras seqüências. Com uma pequena região dos genes *recA* (231 pb) e *ldh* (312 pb) é possível distinguir entre as principais espécies de origem humana *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve* e *B. animalis* (KULLEN, BRADY e O'SULLIVAN, 1997; ROY; SIROIS, 2000). Também, a análise da região do gene *ldh* mostrou que a seqüência de nucleotídeos de *B. lactis* DSM 10140 e *B. animalis* ATCC 27536 foram idênticas, porém diferentes entre *B. lactis* DSM 10140 e *B. animalis* ATCC 25527 (ROY; SIROIS, 2000). O gene parcial da piruvato quinase (300 pb) possibilitou diferenciar *B. infantis* e *B. longum* e também *B. animalis* de *B. lactis* (VAUGIEN; PREVOTS; ROQUES, 2002). Finalmente, análises de seqüências parciais do gene *hsp60* (538 pb) é muito efetiva para diferenciação entre todas as espécies humanas de *Bifidobacterium*. A similaridade é de 93% entre *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum*, 98% entre *B. longum*, *B. infantis* e *B. suis* e 98% entre *B. animalis* e *B. lactis* (JIAN; ZHU; DONG, 2001). O gene *hsp60* é uma poderosa ferramenta para estudo filogenético de espécies de *Bifidobacterium*, melhor que o gene 16S rRNA (WARD; ROY, 2005).



PCR em tempo real para o gene da transaldolase foi usado para detectar e enumerar bifidobactérias em amostras fecais (ROY; SIROIS, 2000). A comparação de contagens de bifidobactérias obtidas por cultivo e a PCR em tempo real mostrou uma boa correlação (MATSUKI; WATANABE; TANAKA, 2003; REQUENA et al., 2002). Esta técnica pode ser usada para detectar diferentes espécies de *Bifidobacterium* com algumas sondas baseadas no gene *hsp60* e pode também ser usada em PCR *multiplex* para a detecção de algumas espécies de *Bifidobacterium* presentes simultaneamente no mesmo produto.

Uma PCR competitiva foi desenvolvida para estimar a quantidade de bifidobactérias em amostras fecais humanas usando dois *primers* gênero-específicos, Bif164f e Bif662r. A PCR-TTGE realizada com os mesmos *primers* também permitiu descrever as espécies de bifidobactérias presentes nas amostras fecais. A PCRc permitiu uma rápida, altamente específica e reprodutível quantificação do gênero *Bifidobacterium*. A TTGE permitiu a identificação de *B. longum* em dez das onze amostras analisadas e *B. adolescentis* e *B. bifidum* em cinco dessas onze amostras. Assim, PCRc e PCR-TTGE podem ser associadas para melhor caracterizar bifidobactéria em amostras fecais humanas (MANGIN et al., 2006).

Tabasco et al. (2007) adotaram meios seletivos sem a adição de antibióticos para isolar as bactérias de uma cultura mista presente em leite fermentado, formada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *Bifidobacterium lactis*. As cepas foram identificadas pelas análises de PCR espécie-específica e DGGE, sendo demonstrado que não há necessidade de isolamento prévio para a sua identificação.

Youn, Seo e Ji (2008) avaliaram 37 (trinta e sete) *primers* de PCR previamente relatados para amplificar as regiões 16S DNAr, 23S DNAr ou seqüências de DNA repetitiva de várias espécies de *Bifidobacterium* e verificaram que somente 10 (dez) dos *primers* mostraram especificidade para identificação de *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. longum* biovar *infantis* e *B. dentium*.

A técnica ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) baseia-se na seleção das enzimas de restrição, visando uma clara distinção entre o padrão e a maior quantidade de espécies. Análises e comparações de mais de um perfil de restrição podem ser necessários para a diferenciação de espécies muito próximas. Um primeiro estudo por Roy e Sirois (2000) demonstrou diferenças entre *B. animalis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* e *B. adolescentis* após uma amplificação da região de 914 pb do gene 16S rRNA e restrição com *Bam*HI, *Sau*3A1 e *Taq*I. O padrão de restrição de cepas de *B. lactis* foi idêntico às cepas de *B. animalis*. *B. longum* apresentou-se muito próximo a *B. infantis*, mas a diferença entre estas espécies foi obtida com a enzima de restrição *Sau*3A1. Alguns resultados similares foram obtidos por Ventura, Reniero e Zink (2001) após a restrição do gene 16S rRNA com *Bam*HI e *Sau*3A1. Contudo, esta equipe demonstrou a possibilidade de diferenciar também *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* com estes padrões. Ventura et al. (2001), em outro trabalho utilizando ARDRA (duas endonucleases de restrição: *Sau*3A1 e *Bam*HI) demonstraram a detecção espécie-específica de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. coryneforme*, *B. cunivuli*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. suis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. pullorum* presentes em diferentes meios micro-ecológicos. Outro estudo por Venema e Maathuis (2003) mostrou a comparação entre todas as espécies de *Bifidobacterium* encontradas no trato digestivo humano, incluindo *B. lactis* e *B. animalis*, sendo feita com uma combinação de seis padrões de restrição de um fragmento do gene 16S ribossômico de 511 a 525 pb com as seguintes enzimas *Taq*I, *Sau*3A1, *Rsa*I, *Alu*I, *Sau*96I e *Nci*I. O sistema ARDRA é uma ferramenta de identificação molecular boa e reprodutível para espécies de *Bifidobacterium* humanas. Com este método a diferenciação entre *B. infantis* e *B. longum* ou entre *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* é possível (ROY; SIROIS, 2000; VENEMA; MAATHUIS, 2003; VENTURA; RENIERO; ZINK, 2001). Enzima *Nci*I foi usada para fazer a distinção entre *B. animalis* e *B. lactis* (VENEMA; MAATHUIS, 2003). Resultados similares foram obtidos por Krizová; Spanová; Rittich (2006).

### 2.3 Probióticos

Os primeiros estudos científicos sobre probióticos datam do começo do século XX, como o trabalho de Metchnikoff, do Instituto Pasteur, que postulou que os probióticos produziam efeitos benéficos no hospedeiro, porque antagonizavam bactérias perniciosas no intestino (FULLER, 1989).

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”. A definição mais utilizada foi atribuída por Fuller (1989), sendo “suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta de forma benéfica seu receptor, através da melhoria do balanço microbiano intestinal”.

Os probióticos são classificados como alimentos funcionais, e segundo a RDC N° 02, de 07 de janeiro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002), são definidos como “micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo”.

Nos últimos anos, estudos sobre probióticos se expandiram significativamente, cada um apresentando uma variedade de benefícios. As listas de características funcionais e de benefícios são comuns a diversos probióticos, porém as bactérias produtoras de ácido láctico são as mais pesquisadas, particularmente *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* (ROLFE, 2000).

Segundo McDonough; Hitchins; Wong (1982), produtos probióticos devem conter cerca de  $10^6$  organismos viáveis por mililitro e deve-se ingerir 100mL/dia, no mínimo duas vezes por semana, para obter o efeito desejável.

Entre os benefícios creditados aos produtos de laticínios probióticos, citados por Sgarbieri e Pacheco (1999) incluem-se: promoção do crescimento, em estudos com ratos e aves; produção de vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico); aumento na absorção de minerais; aumento da resposta imune, pela elevação na produção de imunoglobulina A; diminuição da população de

patógenos, através da produção de ácido acético e ácido láctico e de bacteriocinas; redução da intolerância à lactose; supressão de enzimas microbianas potencialmente prejudiciais, associadas com o câncer de cólon, em animais; estabilização da microbiota intestinal, especialmente após severos estresses intestinais ou uso de antibióticos; alívio da constipação; redução do colesterol sanguíneo e efeito antimutagênico .

### **2.3.1 Bifidobactérias Probióticas**

O gênero *Bifidobacterium*, juntamente com os *Lactobacillus*, destacam-se como as principais culturas probióticas, sendo assim usadas como aditivos em diversos produtos. Entre os benefícios à saúde atribuídos às bifidobactérias citam-se a melhoria da digestibilidade, elevação do valor nutritivo, maior utilização da lactose, ação antagônica contra agentes patogênicos entéricos, colonização do intestino, ação anticarcinogênica, ação hipocolesterolêmica, modulação imunitária e inibição de infecções intestinais (VINDEROLA et al., 2000).

O aumento do valor nutritivo e terapêutico trazido pelas bifidobactérias gerou interesse no sentido de incorporação das mesmas em determinados alimentos, sendo que os veículos existentes integram três grandes grupos: alimentos infantis, leites fermentados e outros produtos lácteos e preparações farmacêuticas (RASIC; KURMANN, 1983 citados por GOMES; MALCATA, 2002). Destes, o grupo que registra maior desenvolvimento é o de laticínios, sendo os produtos mais comuns os leites fermentados (MEDINA; JORDANO, 1994) e os iogurtes (RYBKA; KAILASAPATHY, 1995, citados por VINDEROLA et al. 2000), além de sorvetes (HELMAT; McMAHON, 1992, citados por VINDEROLA et al. 2000) e alguns tipos de queijos (DINAKAR; MISTRY, 1994; BLANCHETTE; ROY, 1995; GOMES; MALCATA, 1998; VINDEROLA et al., 2000).

As bifidobactérias, para uso como um agente probiótico (FULLER, 1989) devem seguir critérios de seleção, como possuir boa tolerância ao ácido, aos metabólitos tóxicos (ex. fenol) e sais biliares (para assegurar a manutenção de um

número elevado de células viáveis durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal), possuir atividade antimicrobiana e serem capazes de gerar um produto final com sabor e textura aceitáveis e com população mínima de  $10^6$  UFC/mL (RASIC; KURMANN, 1983 citados por GOMES; MALCATA, 2002).

A seleção de cepas resistentes ao ácido e aos sais biliares é importante na avaliação do potencial de bifidobactérias para utilização como probiótico, uma vez que a bactéria probiótica necessita atravessar o estômago antes de atingir o intestino, seu habitat natural (TESHIMA, 2001).

### **2.3.1.1 Resistência à bile**

Sintetizados no fígado a partir do colesterol, os ácidos biliares são liberados da vesícula biliar para o duodeno na sua forma conjugada (cerca de 500 a 700 mL/dia). No jejuno, a concentração de ácidos biliares é cerca de 10 mM/L e no íleo a concentração diminui para cerca de 4 mM/L devido a sua absorção ativa (MARTEAU et al., 1997). No cólon, em particular, os ácidos biliares sofrem intensa modificação química (desconjugação, desidroxilação, desidrogenação e desglucuronização), principalmente por ação de bactérias, e tanto os ácidos biliares conjugados como os desconjugados exibem atividade antibacteriana, sendo que as formas desconjugadas são mais inibitórias sobre algumas espécies bacterianas (DUNNE et al., 1999).

O estresse das bactérias na presença dos sais biliares no trato gastrointestinal é mais complexo do que nas condições *in vitro*, pois a concentração da bile não é estática ao longo do trato gastrointestinal e o tempo de residência da digesta varia em cada segmento (MARTEAU et al., 1997).

Algumas cepas de bifidobactérias possuem capacidade de desconjugar os sais biliares, sendo que os ácidos cólico, taurocólico e glicocólico possuem um efeito inibitório de 70 a 80% sobre o crescimento de algumas cepas de bifidobactérias (IBRAHIM; BEZKOROVAINY, 1993).

Thorton (1996), citado por Dunne et al. (1999) avaliou a resistência de novos isolados humanos de *Bifidobacterium* à bile bovina, suína e humana, verificando que esses isolados são menos resistentes à bile bovina e suína do que à humana. Em humanos os sais biliares se encontram em forma de micelas com fosfolípídeos e possuem menor atividade antibacteriana do que as soluções de sais biliares de origem animal (MARTEAU et al., 1997).

Dados observados por pesquisadores diferem em relação à resistência de bactérias bífidas à bile. Enquanto resultados *in vitro* obtidos por Ibrahim e Bezkorovainy (1993) demonstraram que *Bifidobacterium infantis* apresenta maior resistência à bile do que *B. breve*, *B. bifidum* e *B. longum*. Clark; Martin (1994) observaram que *B. longum* foi mais resistente à bile do que *B. infantis*, *B. adolescentis* e *B. bifidum*. Verifica-se, portanto, que existe uma grande variação na resistência de bifidobactérias à bile, havendo a possibilidade dessa resistência ser específica para cada cepa.

### **2.3.1.2 Resistência ao suco gástrico**

O estômago humano secreta ácido clorídrico para realizar a digestão dos alimentos, fazendo com que o pH do meio seja inferior a 3,0. Para sobreviver nas condições *in vivo*, as cepas probióticas devem ser capazes de tolerar pH baixo, passando intactas pela parte superior do trato gastrointestinal.

Em Teshima (2001), as culturas de *Bifidobacterium* isoladas apresentaram elevada resistência ao suco gástrico em pH 2,0, mas considera-se que, em determinadas condições, o pH gástrico pode ser menor e a resistência diminuída.

Porém, considerando-se que o veículo carreador de organismos probióticos geralmente é o leite desnatado ou iogurte, que ajudam a aumentar o pH gástrico, a resistência pode ser aumentada devido à influência de substâncias protetoras presentes nesses produtos (CLARK; COTTON; MARTIN, 1993).

Utilizando um modelo dinâmico de simulação das condições fisiológicas do trato gastrointestinal, Marteau et al. (1997) demonstraram que *B. bifidum* apresenta 67% de sobrevivência após a passagem pelo compartimento gástrico (180 minutos). A resistência dessa mesma cepa, avaliada em humanos, não apresentou diferença significativa das condições *in vitro*.

A característica espécie-específica ou cepa-específica é evidenciada por vários autores. Clark; Cotton; Martin (1993) demonstraram que *B. infantis* possui maior resistência ao pH 2,0 do que *B. adolescentis*, *B. longum* e *B. bifidum*, enquanto que Lankaputhra; Shah (1995) verificaram que *B. longum* apresentou maior resistência ao suco gástrico do que *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis*.

Resultados obtidos por Berrada et al. (1991), com duas cepas comerciais de *Bifidobacterium* demonstraram que apenas uma cepa possuía resistência ao pH 3,0, mantendo níveis iniciais de  $10^7$  UFC/mL após 90 minutos de incubação. Essas cepas foram também avaliadas em humanos, verificando-se que a cepa ácido resistente sobreviveu melhor do que a não resistente.

### **2.3.1.3 Perfil de hidrofobicidade**

Uma característica desejada para um probiótico é a capacidade de aderência à mucosa intestinal, permitindo a sua permanência e atuação no ecossistema digestivo, excluindo ou reduzindo a aderência de enteropatógenos (BARBOSA et al., 2005).

A aderência das bactérias à mucosa intestinal, sejam patogênicas ou não, envolve a participação de adesinas bacterianas, dos componentes da parede celular e de receptores da mucosa intestinal. A interação entre esses elementos promove a fixação da bactéria à mucosa, o que impede a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e pelas correntes de fluidos que tendem a levá-las para o exterior do

organismo. A capacidade de aderir às células derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa, já foi demonstrada para cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizadas como probióticas (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

Segundo Pelletier (1997), numerosos estudos físico-químicos de superfícies celulares microbianas têm demonstrado relações entre cargas superficiais, hidrofobicidade e a composição elementar da superfície celular. Ele indicou que, a presença de glicoproteínas na superfície celular, resulta em alta hidrofobicidade como no caso de *B. lactis* Bb12, e que a baixa hidrofobicidade está associada à presença de polissacarídeos como no caso do *B. longum* Bb46. Demonstrou que a cepa Bb12 é forte doadora e fraca receptora de elétrons e supôs que esta cepa possui maior probabilidade de adesão ao epitélio intestinal, já que este possui um perfil superficial lipídico mais acentuado, sendo assim mais indicada como probiótica, quando comparada a *B. longum* Bb46.

#### **2.3.1.4 Atividade antimicrobiana**

Vários mecanismos são sugeridos para a ação inibitória de bifidobactérias contra patógenos Gram negativos, incluindo o decréscimo do pH local pela produção de ácidos orgânicos, a ação inibidora de moléculas não dissociadas dos ácidos orgânicos, a competição por nutrientes, a competição por sítios de adesão, a estimulação da imunidade do intestino, e a produção de substâncias antibacterianas específicas (FULLER, 1989; DE VUYST et al., 2004, citados por MAKRAS; DE VUYST, 2006).

Touré et al. (2003), verificaram a atividade antimicrobiana de seis isolados de bifidobactérias codificados como RBL 67, RBL68, RBL69, RBL70, RBL85 e RBL86, mostrando serem mais ativas contra *Listeria monocytogenes* que as cepas usadas como padrões.

Makras; De Vuyst (2006), analisaram cepas de bifidobactérias quanto à produção de substâncias antimicrobianas ativas contra bactérias Gram negativas,



como *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* SL1344 e *Escherichia coli* C1845, e constataram que houve inibição pela produção de ácido acético e láctico, que provocou a diminuição do pH intracelular, conduzindo à morte do patógeno.

A produção de bacteriocinas por cepas de bifidobactérias é pouco documentada. Porém, duas bacteriocinas, bifidina e bifidocina B, produzidas por *Bifidobacterium bifidum*, foram relatadas. Bifidocina B é a única bacteriocina produzida por bifidobactérias que foi purificada, caracterizada e constatada como responsável pela inibição do crescimento de espécies de *Listeria*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (YILDIRIM; JOHNSON, 1998; YILDIRIM et al., 1999).

### **2.3.2 Aspectos tecnológicos das cepas probióticas**

A seleção de cepas baseadas em atitudes tecnológicas é um aspecto crítico do desenvolvimento de um alimento funcional probiótico. As bactérias probióticas devem exibir resistência aos processos tecnológicos usados na preparação do veículo (MORI et al., 1997).

As bactérias probióticas podem ser adicionadas basicamente de três modos: 1) como componente da cultura starter, onde o micro-organismo probiótico deverá crescer nos parâmetros de tempo e temperatura, nas condições de processamento e estocagem praticadas, atingindo ou mantendo populações acima de  $10^6$  UFC/g, necessárias para sua funcionalidade; 2) adição de cultura concentrada junto com a cultura starter no início do processamento, onde não se espera o crescimento da bactéria probiótica, mas que o produto seja carreador, sendo que os parâmetros de processamento e manutenção devem ser avaliados para que os números do micro-organismo probiótico sejam mantidos até o momento do consumo e suficientes para inferir a funcionalidade; 3) adição de uma cultura concentrada após a fermentação e antes do envase, onde espera-se que o produto seja carreador e que a viabilidade dos micro-organismos probióticos não seja comprometida durante a vida de prateleira do produto (FERREIRA, 2003).

Muitas bifidobactérias adicionadas aos produtos lácteos podem não exercer a atividade probiótica, pois seu crescimento pode ser inibido após exposição ao ácido durante ou após a fermentação, ao oxigênio durante a distribuição e estocagem refrigerada, e/ou ao ácido estomacal humano após ingestão (MAUS; INGHAM, 2003).

Deste modo, o sucesso dos alimentos contendo bifidobactérias dependerá da viabilidade no produto durante toda a vida útil, bem como da sua resistência às condições do sistema gastrointestinal superior (SUN; GRIFFITHS, 2000).

Combinações de diferentes cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* são utilizadas tradicionalmente em produtos lácteos fermentados, sendo selecionadas com base em critérios médicos, científicos e tecnológicos (COLLINS; THORTON; SULLIVAN, 1998). Estas culturas devem tolerar o processo de fabricação ao qual serão submetidas e manter a viabilidade durante a estocagem, o que dependerá de fatores como pH, presença de aditivos e ocorrência de inibidores microbianos (CHARTERIS et al., 1998).

Quando a adição do probiótico ocorre após a fermentação, as interações com os componentes alimentares podem ser mínimas, pois a atividade metabólica é reduzida drasticamente à temperatura de refrigeração. Entretanto, se o tempo de estocagem for longo, podem ocorrer pequenas interações mensuráveis (HELLER, 2001).

### **2.3.2.1 Tolerância à acidez**

Na produção de leites fermentados, o pH final ideal é de aproximadamente 4,7. Este pH deve ser alcançado em, no máximo, 24 h para garantir a segurança microbiológica do produto durante a estocagem e para evitar que o pH decresça a valores muito baixos durante o armazenamento. As bactérias probióticas têm baixa capacidade de acidificação, sendo utilizadas em associação com culturas bioajustadoras (HELLER, 2001).

Apesar do pH não ser o único fator envolvido no crescimento das bactérias probióticas, é limitante na manufatura de produtos alimentares, tendo em vista a dificuldade de desenvolvimento de *Bifidobacterium* spp. em pHs inferiores a 4,5 (SCARDOVI, 1986).

### 2.3.2.2 Presença de oxigênio

Um dos aspectos tecnológicos a ser considerado na seleção de probióticos é a viabilidade dos micro-organismos durante o processamento (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002), e entre os fatores significantes que afetam a viabilidade das bifidobactérias está o oxigênio. A toxicidade ao oxigênio é um problema importante quando bifidobactérias são cultivadas para aplicações industriais. Contudo, algumas cepas são consideradas moderadamente aerotolerantes, sendo que elas sobrevivem na presença de ar (DE VRIES; STOUTHAMER, 1969; MEILE et al., 1997; BEERENS; GAVINI; NEUT, 2000; TALWALKAR et al., 2001).

Bifidobactérias são consideradas como altamente susceptíveis ao oxigênio, embora esta tolerância dependa da espécie (SHIMAMURA et al., 1992). O oxigênio pode afetar estes organismos pela sua toxicidade às células e pela produção de peróxido de hidrogênio. Meile et al. (1997) demonstraram que *B. animalis* subsp. *lactis*, isolada de leites fermentados, apresentou boa tolerância ao oxigênio.

Beerens, Gavini e Neut (2000), verificaram o efeito da exposição ao ar de 84 cepas de bifidobactérias isoladas de alimentos. As espécies de origem animal (*B. thermophilum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*) mostraram-se mais resistentes ao oxigênio do que aquelas de origem humana, porém todas as bifidobactérias examinadas foram suficientemente aerotolerantes.

González et al. (2004), realizaram estudo para determinar o efeito do oxigênio no crescimento de *Bifidobacterium infantis* e os principais produtos formados (lactato, acetato e formato). A inoculação no meio com CO<sub>2</sub>, seguida da

incorporação gradual de oxigênio com baixo fluxo de ar, resultou não somente na aerotolerância da cepa, mas também em aumento da produção de lactato. Sugeriram a aplicação das condições de fermentação por eles utilizadas para a fabricação de preparados probióticos a fim de neutralizar os efeitos do oxigênio na produção de biomassa pelo *B. infantis*; e que as alterações na concentração dos metabólitos finais observadas nas fermentações aeradas abriram a possibilidade de balancear as razões acetato: lactato com propósitos sensoriais.

### **2.3.2.3 Presença de ingredientes e aditivos alimentares**

Os aditivos alimentares são indispensáveis na fabricação de bebidas e outros derivados lácteos. Eles tornam-se parte do alimento, a fim de estabelecer características sensoriais próprias e definidas, assim como o sabor, a aparência, a consistência e a vida útil (NAKAZAWA; HOSONO, 1992; GILLILAND, 1998, citados por VINDEROLA et al., 2002).

Vinderola et al. (2002) verificaram a influência de aditivos utilizados em produtos lácteos fermentados no crescimento dos iniciadores ácido-lácticos e das bactérias probióticas, constatando que adoçantes, compostos aromáticos, natamicina, agentes flavorizantes e o flavorizante corante de pêssego não influenciaram no crescimento das cepas nas concentrações utilizadas pela indústria. O efeito de outras substâncias, especialmente agentes flavorizantes corantes, foi dependente da espécie bacteriana.

#### **2.3.2.3.1 Ingredientes**

A indústria de laticínios tem mostrado grande interesse em desenvolver novos produtos lácteos fermentados por micro-organismos probióticos. A matéria-prima mais utilizada era o leite de vaca, porém, cada vez mais o mercado abre-se para o desenvolvimento de novos produtos, em particular, a base de soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja (TORTELLI, 2002).

### 2.3.2.3.1.1 Leite de vaca

O leite é definido como a secreção de pH neutro (6,5 a 6,7), da glândula mamária de mamíferos. Ele é uma emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. O leite contém, também, enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células (epiteliais, leucócitos, bactérias e leveduras), dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio. Por isso, do ponto de vista físico, o leite constitui um sistema complexo (RIEL, 1991).

A gordura do leite é uma mistura de triglicerídeos, que contém mais de 17 ácidos graxos, vitaminas (A, D, E, K) associadas, fosfolipídeos (cefalina e lecitina), em combinação com o álcool glicerol. O ácido graxo mais abundante é o oleico, que juntamente com o linoleico e ácidos graxos de cadeia mais curta (butírico e caproico) são responsáveis pelo ponto de fusão relativamente baixo da gordura do leite. É um dos componentes do leite que sofre maior variação, pois sua concentração depende de fatores como a alimentação, período de lactação, estação do ano e raça do animal. O tamanho dos glóbulos pode variar de 0,1 a 14  $\mu\text{m}$  (média de 2 a 5  $\mu\text{m}$ ) (TRONCO, 1996). O leite de vaca contém, em média, 35 g de gordura/litro (RIEL, 1991).

As proteínas do leite são genericamente divididas em dois grupos: caseínas (80%) e proteínas do soro (20%). As caseínas formam partículas coloidais (micelas), compostas por diversas frações desta proteína, entre elas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, enquanto que as proteínas do soro encontram-se dissolvidas na fase aquosa do leite (SPREER, 1991). Na caseína, a principal força de estabilidade é dada pelas cargas elétricas dos seus aminoácidos formadores, mas pode ser coagulada pela ação de ácidos, coalho ou álcool. As proteínas do soro, por sua vez, permanecem em solução frente à ação de ácidos ou coalho porque nestas, a principal força estabilizadora é a água de hidratação, porém, na presença de calor ou álcool estas proteínas coagulam devido à ação desidratante destes agentes (TRONCO, 1996).

O açúcar do leite, a lactose, encontra-se totalmente dissolvido na sua fase aquosa. É um dissacarídeo composto por glicose e galactose. A importância da lactose em tecnologia é muito grande, podendo servir como substrato dos processos fermentativos e também para desencadear certas reações desejáveis (ex. escurecimento). Seu poder adoçante é baixo, o que favorece a palatabilidade no preparo de leites concentrados (TRONCO, 1996).

Os minerais representam ao redor de 0,6% a 0,8% do peso do leite. No leite de vaca, os sais predominantes são o potássio (150 mg/ 100 mL), o cálcio (120 mg/100 mL) e o fósforo (100 mg/100 mL) (PAGLIARINI et al., 1993). Aos minerais podem ser atribuídas uma série de valiosas contribuições. O cálcio é o elemento fundamental no processo de coagulação. Os citratos são os substratos de fermentação de bactérias heterofermentativas. A grande maioria responde pelo processo de termoestabilidade do leite, enquanto que ferro e cobre são catalisadores de reações de oxidação (TRONCO, 1996).

O leite é uma boa fonte de vitaminas, mas a quantidade das lipossolúveis (A, D e E) depende do teor de gordura (MEDRANO; HERNANDEZ, 1994). A vitamina com maior expressão no leite integral é o retinol ou vitamina A, cujo teor por litro varia de 700 UI a 1600 UI, dependendo da estação do ano e da ração animal (DRACZ; BRANDÃO, 1994). As vitaminas podem ser alteradas ou destruídas por diversos processos como: tratamentos térmicos inadequados, oxidações e ação da luz. As vitaminas A, procarotenos, C, E e tocoferóis exercem atividade antioxidante que protege a gordura do leite (TRONCO, 1996).

As enzimas do leite são substâncias altamente específicas, as quais dependem do pH e da temperatura para desencadear sua ação. Algumas enzimas importantes são as lipases, peroxidases, catalases, fosfatases. De interesse industrial estão a fosfatase alcalina e a peroxidase, utilizadas amplamente no controle do grau de aquecimento de leites processados (TRONCO, 1996).

No Brasil, o leite próprio para o consumo é encontrado disponível no mercado, principalmente, nas formas em pó ou líquida pasteurizada e longa vida. O leite em pó é obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1997). O leite pasteurizado é o produto submetido ao tratamento térmico de 72°C a 75°C, durante 15 a 20 segundos, seguindo-se de resfriamento imediato até temperatura igual ou inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Entende-se por leite longa vida ou UAT (ultra alta temperatura – UHT) o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1996).

Ferreira (2003), ressalta que, de um modo geral, as bactérias bífidas não crescem muito bem no leite; produzem pouco ácido, prolongando o tempo de fermentação, e para iniciar o crescimento, exigem um meio com baixo potencial de oxi-redução, além de fatores de crescimento. A taxa de produção de ácido é crítica para a qualidade e vida de prateleira do produto lácteo fermentado, daí a importância desses produtos atingirem pH 4,6 num período máximo de 24 horas, o que geralmente não é possível com as culturas lácticas probióticas.

#### **2.3.2.3.1.2 Extrato ou “Leite” de Soja**

A Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA/MS, a RDC N° 91, de 18 de outubro de 2000, aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos com Soja e define o extrato de soja como o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (BRASIL, 2000).

O extrato de soja tem sido usado para a produção de produtos semelhantes ao iogurte (BUONO et al., 1990; CHENG et al., 1990), porém propriedades organolépticas deficientes foram responsáveis pela baixa aceitação pelo consumidor, quando comparado aos derivados de leite de vaca. A principal objeção destes derivados do extrato de soja foi seu sabor/odor a “grão”, devido à presença dos desagradáveis *off-flavor* de *n*-hexanal e pentanal, os quais estão naturalmente presentes em extrato de soja como produtos da quebra dos ácidos graxos insaturados (MATOBA et al., 1985). Murti et al. (1993), relataram a habilidade de *Bifidobacterium* spp. reduzir o *off-flavor* de *n*-hexanal.

Extrato de soja é rico em proteínas de alta qualidade, não contém colesterol, nem lactose e somente pequenas quantidades de ácidos graxos saturados, e pode ser fornecido para pessoas que são lactase-deficientes (SCALABRINI et al., 1998).

O Extrato de soja é um bom meio para o crescimento de bifidobactérias porque contém sacarose, rafinose e estaquiose, açúcares que são fermentados pela maioria das cepas pertencentes a este gênero. A rafinose e a estaquiose são indigeríveis pelos mamíferos e podem causar flatulência em humanos (DESJARDINS et al., 1990).

Shimakawa et al. (2003), avaliaram os efeitos probióticos de extrato de soja fermentado com *Bifidobacterium breve*. A bactéria bífida foi capaz de crescer no extrato de soja ( $10^9$  UFC/mL), sem a presença de aditivos. Durante o armazenamento (10°C por 20 dias) do extrato de soja fermentado não houve alteração na contagem de células viáveis, bem como foi verificado um aumento no número total de bifidobactérias nas fezes dos indivíduos que consumiram o produto probiótico, indicando que o extrato de soja fermentado com cepa de *B. breve* poderia ser um novo tipo de alimento probiótico.

As bifidobactérias parecem promissoras culturas iniciadoras para a produção de produtos fermentados à base de extrato de soja com bom sabor e que



contenham quantidades reduzidas de fatores antinutricionais (SCALABRINI et al., 1998).

#### **2.3.2.3.1.3 Soro de Queijo ou de Leite**

O soro lácteo pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 90% do volume do leite, levando consigo 50 a 55% dos sólidos totais do mesmo (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

A composição do soro varia com a qualidade do leite, o tipo de queijo de origem, o tratamento térmico, o manuseio, entre outros fatores (VILELA et al., 2001). O soro pode ser classificado em soro doce, quando é obtido a partir da ação de uma enzima proteolítica, cujo pH aproximado é 6,4, e soro ácido, quando é resultante da coagulação do leite por ação de um ácido e aquecimento (85°C a 90°C), com pH aproximado de 4,5 (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O soro contém a maioria dos minerais e vitaminas hidrossolúveis, principalmente do complexo B. As proteínas presentes no soro, representadas pela  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soroalbumina bovina e imunoglobulina, são consideradas de grande importância nutricional, devido aos tipos de aminoácidos presentes (SINHA et al., 2007), além disso, apresentam propriedades funcionais de grande interesse para a indústria de alimentos, como a solubilidade em ampla faixa de pH, a alta capacidade de retenção de água e as propriedades emulsificantes (CHATTERTON et al., 2006). Cerca de 70% da lactose está presente no soro, a qual constitui fonte de energia considerável para os micro-organismos e, portanto, é possível utilizá-lo como substrato de fermentações a fim de obter diversos produtos de aplicação industrial (SPREER, 1991).

A utilização do soro na indústria alimentícia vem sendo estudada por diversos autores, e cada vez mais tem-se utilizado essa matéria prima na elaboração de novos produtos, seja como simples substituto da água ou como ingrediente de

funcionalidade reológica ou nutricional. Esses novos produtos passaram a fazer parte da dieta da população, incluindo os idosos e principalmente as crianças (TEIXEIRA; FONSECA; MENEZES, 2007).

Para Pien, citado por Almeida; Bonassi; Roça (2001), bebidas lácteas à base de soro são de grande valor dietético, de fácil digestão, leves e agradáveis para serem consumidas. Para os laticínios, conversão do soro líquido em bebidas, fermentadas ou não, é uma das mais atrativas opções, para a utilização do soro para consumo humano, devido à simplicidade do processo, utilização de equipamentos de beneficiamento do leite, além das excelentes propriedades funcionais das proteínas do soro (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001).

Castro (2007) analisou o emprego de diferentes proporções de soro de queijo e oligofrutose no desenvolvimento de bebida láctea funcional, desenvolvida com a cultura mista formada por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, constatando que as variáveis proporções de soro e concentração de oligofrutose, nos níveis estudados, não apresentaram influência no tempo de fermentação, acidez e contagem de células viáveis probióticas sugerindo que o uso de soro líquido na produção de bebidas lácteas fermentadas probióticas pode melhorar o seu aproveitamento e consumo na nutrição humana.

Cunha et al (2008), avaliaram a composição físico-química, a contagem de células viáveis de bactérias probióticas e a reologia de bebida láctea fermentada elaborada com 70% de leite e 30% de soro de queijo e leite fermentado elaborado com 100% de leite, armazenadas a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Antes e após o período de fermentação não foram observadas diferenças entre a contagem de células viáveis probióticas nas amostras 1 (leite e soro) e 2 (somente leite). A manutenção da contagem de células viáveis probióticas no produto fermentado não foi influenciada pelo uso da cultura mista adicionada (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* Bb-12), demonstrando que a incorporação do soro de queijo pode gerar benefícios através da obtenção de produtos probióticos.

#### 2.3.2.3.1.4 Bactérias do iogurte

Entende-se por iogurte, yogur ou yoghurt o leite fermentado cuja fermentação se realiza com os cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

A atividade proteolítica dos bacilos promove a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, especialmente valina, que favorecem o crescimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula o crescimento dos bacilos devido à produção de ácido fórmico, gás carbônico e a redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (SHAH, 2001).

Recentemente, os iogurtes têm sido reformulados para incluir linhagens vivas de *Lactobacillus acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium*, além dos organismos da cultura tradicional de iogurte *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Assim, o bioiogurte é o iogurte que contém micro-organismos probióticos vivos que proporcionam o aumento dos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (SHAH, 2001).

Diversos fatores afetam o crescimento e a viabilidade das bactérias probióticas no produto. Entre eles, pode-se destacar o ácido e peróxido de hidrogênio produzidos pelas bactérias do iogurte, o pH, o aumento da acidez durante o armazenamento, a temperatura de armazenamento, a presença de conservantes e de outros micro-organismos, a concentração de oxigênio contida no produto e a permeabilidade do oxigênio através da embalagem e a disponibilidade de fatores de crescimento (DAVE; SHAH, 1998).

Do ponto de vista econômico, não é viável fermentar o leite usando apenas micro-organismos probióticos devido ao maior tempo de fermentação requerido para reduzir o pH do leite para 4,6 e também ao sabor desagradável provocado por

algumas linhagens de bactérias probióticas. Atualmente, os micro-organismos da cultura tradicional do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) são empregados em combinação com as bactérias probióticas para reduzir o tempo de fermentação e melhorar o sabor, corpo e textura do produto final (DAVE; SHAH, 1997).

### **2.3.2.3.2 Aditivos Alimentares**

No Brasil, a legislação define aditivo alimentar sendo qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997b).

A FAO/WHO define aditivo de alimento como uma substância não nutritiva adicionada intencionalmente ao alimento, geralmente em quantidades pequenas para melhorar a aparência, sabor, textura e propriedades de armazenamento (WHO, 1955).

Dois fatores geralmente são levados em consideração na elaboração de uma lista de aditivos legalmente permitidos. O primeiro diz respeito à necessidade de sua utilização e o segundo se refere a sua inocuidade em relação à saúde pública. De um modo geral, os aditivos devem ser utilizados preferivelmente como um meio suplementar nos processos industriais de alimentos e não com o objetivo de substituí-los.

O uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado. A lista de aditivos

alimentares constante da legislação vigente está sujeito à atualização de acordo com o avanço dos conhecimentos técnicos e científicos (BRASIL, 1997b)

Os aditivos alimentares estão classificados de acordo com a função que possuem no alimento, seguindo a Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997, sendo as funções classificadas (BRASIL, 1997b).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS) declara que a legislação brasileira sobre aditivos alimentares é positiva e estabelece que um aditivo somente pode ser utilizado pela indústria alimentícia quando estiver explicitamente definido em legislação específica, com as respectivas funções, limites e categorias de alimentos permitidas (BRASIL, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) MAPA Nº 46, de 23/10/2007 (BRASIL, 2007), a qual adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, não se admite o uso de aditivos na elaboração de leites fermentados para os quais se tenham utilizado exclusivamente ingredientes lácteos. Excetua-se desta proibição a classe “desnatados”, na qual se admite o uso de aditivos espessantes/estabilizantes. Nos leites fermentados com adições (adicionados de ingredientes opcionais não lácteos, antes, durante ou depois da fermentação, até um máximo de 30% m/m,) admite-se o uso de todos os aditivos que se encontram na referida IN, nas concentrações máximas indicadas no produto final. No caso particular do agregado de polpa de fruta ou preparado de fruta, ambos de uso industrial, admitir-se-á, além disso, a presença de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio em uma concentração máxima de 300mg/kg (expressos em ácido sórbico) no produto final.

Para a elaboração de queijos poderão ser utilizados os aditivos relacionados na Portaria MAPA Nº 146, de 07/03/1996 (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos), indicando a classe do queijo para a qual ou as quais estão autorizadas (BRASIL, 1996). A utilização de outros aditivos poderá estar autorizada nos padrões individuais de certas variedades particulares de queijos.

A Instrução Normativa MAPA Nº 16, de 23/08/2005, a qual aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, autoriza na elaboração de bebida láctea o uso de aditivos das categorias de acidulante, aromatizante, regulador de acidez, corante, espessante, estabilizante, emulsificante e conservante descritos na Tabela 2 do item 5 da referida instrução normativa (BRASIL, 2005).

#### **2.4 Prebióticos e simbióticos**

Cepas probióticas, assim como lactobacilos e bifidobactérias, para exercerem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, precisam ser metabolicamente ativas no local desejado do intestino, necessitando de carboidratos como fonte de energia.

A oferta de carboidratos fermentescíveis é um fator importante e limitante do crescimento de bactérias no cólon, contudo, algumas conseguem transformar e utilizar os substratos disponíveis. Os açúcares simples e dissacarídeos são absorvidos eficientemente no intestino delgado e não chegam ao intestino grosso. Porém, carboidratos mais complexos (ex. frutooligossacarídeos - FOS) não são digeridos por humanos e passam através do intestino delgado, ficando disponíveis para a microbiota colonizadora do cólon (COLLINS; THORTON; SULLIVAN, 1998).

Essas substâncias são chamadas prebióticos e são definidas como ingredientes alimentares não digeríveis os quais afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a ativação de um ou de um número limitado de bactérias promotoras da saúde no trato intestinal, melhorando o balanço intestinal do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Para um ingrediente alimentar ser considerado prebiótico, não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal, deve promover seletivamente o crescimento e/ou estimular a atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde e não o de outras bactérias, alterando a microbiota

colonizadora em favor de uma composição mais saudável (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A ingestão destas substâncias prebióticas com uma cepa probiótica resulta num efeito simbiótico, os quais favorecem o aumento do crescimento das cepas no intestino. O aspecto mais interessante dos prebióticos é que eles possibilitam o crescimento de bifidobactérias e outras bactérias Gram positivas, mas não são utilizados pela maioria das bactérias Gram negativas presentes no cólon (COLLINS; THORTON; SULLIVAN, 1998).

FOS não podem ser usados pelas bactérias putrefativas, assim como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* e *Escherichia coli*. Crianças amamentadas apresentam contagens mais elevadas de bifidobactérias no trato intestinal do que em bebês alimentados com formulados devido a presença de frutooligossacarídeos no leite humano. A incorporação de lactulose em níveis de 0,5-1,0% nas fórmulas alimentares estimularam bifidobactérias na mesma proporção observada em bebês não amamentados (0,5% de lactulose não apresenta efeito laxativo) (NAGENDRA et al., 1995). Os produtos do metabolismo de FOS, ácidos graxos de cadeia curta, reduzem o pH intestinal, os quais exercem um papel essencial no controle dos níveis populacionais do intestino pela supressão do crescimento de bactérias putrefativas e patogências (MITSUOKA, 1984, citado por COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998).

## **2.5 Benefícios dos probióticos, prebióticos e simbióticos à saúde**

### **2.5.1 Aumento da biodisponibilidade de minerais**

Estudos têm evidenciado a aparente influência da microbiota intestinal no aumento da biodisponibilidade de minerais, principalmente cálcio e magnésio. Aumento na absorção do cálcio no intestino grosso devido ao consumo de frutooligossacarídeos (OHTA et al., 1995; WOLF; FIRKINS; ZHANG, 1998) e inulina (LEVRAT et al., 1994) foram demonstrados.

Igarashi et al. (1994), citados por Teshima (2001), estudaram o efeito de *Bifidobacterium longum* e lactulose na resistência óssea de ratas ovariectomizadas, simulando um modelo de osteoporose e verificaram que além do aumento do número de bifidobactérias nas fezes, a resistência do fêmur também foi aumentada, sugerindo que a administração do simbiótico pode promover o aumento da absorção de cálcio.

### **2.5.2 Resistência aos patógenos**

A microbiota intestinal contribui na proteção do hospedeiro contra patógenos exógenos, prevenindo o estabelecimento desses micro-organismos no trato gastrointestinal. Este efeito é conhecido como “resistência à colonização”, “exclusão competitiva” ou “efeito barreira” (FULLER, 1999, citado por TESHIMA, 2001).

Distúrbios na microbiota normal, principalmente após o tratamento com antibióticos ou radioterapia, podem deixar o hospedeiro vulnerável à colonização por patógenos exógenos, bem como ao aumento do número desses organismos endógenos, pois esses tratamentos provocam a eliminação ou diminuição de certos grupos bacterianos benéficos, favorecendo a proliferação dos patógenos em potencial (MITSUOKA, 1990).

A ingestão de células viáveis de bifidobactérias e o estímulo do crescimento de bactérias bífidas endógenas auxiliam no restabelecimento da microbiota intestinal, reduzindo assim a oportunidade de colonização dos organismos patogênicos, principalmente pela produção de ácidos orgânicos, e consequente diminuição do pH. Resultados *in vivo* e *in vitro* demonstraram o antagonismo de bifidobactérias ao crescimento de enteropatógenos como *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Campylobacter jejuni* (GOMES; MALCATA, 1999).



### 2.5.3 Redução de compostos cancerígenos

Koo; Rao (1991) estudaram o efeito da ingestão de bifidobactérias e FOS sobre a formação de tumor de cólon induzido quimicamente em camundongos. Os animais tratados com a dieta simbiótica apresentaram menor incidência de alterações tumorais no intestino, maior contagem fecal de bifidobactérias e menor pH intraluminal. Os resultados foram significativos e indicaram haver um efeito anticarcinogênico pelas bactérias bífidas.

Números elevados de tumores no fígado foram desenvolvidos em camundongos associados com a presença de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium paraputrificum*. Entretanto, a proliferação de tumores diminuiu consideravelmente na presença de *Bifidobacterium longum*, sendo sugerido que bifidobactérias removem a fonte de pró carcinogênicos ou as bactérias putrefativas, que possuem enzimas que participam na conversão de compostos carcinogênicos ou pró carcinogênicos (MITSUOKA, 1990). Além disso, a diminuição do pH pode reduzir a biodisponibilidade de aminas tóxicas, protegendo o cólon contra carcinogênese (GALLAHER et al., 1996).

### 2.5.4 Efeito hipocolesterolêmico

A ingestão de FOS e inulina demonstrou efeitos na redução dos níveis de triacilglicerol sérico em ratos e humanos (CANZI et al., 1995, citados por TESHIMA, 2001; FIORDALISO et al., 1995). Um mecanismo proposto para o efeito hipolipidêmico de prebióticos está relacionado com a produção de propionato, que inibe a síntese de colesterol hepático (CHEN et al. 1984, citados por TESHIMA, 2001).

A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácidos biliares pode também influenciar o nível de colesterol. Os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídeos do trato gastrointestinal quando comparado com ácidos conjugados, aumentando a excreção do colesterol na forma de coprostanol (KIM; SHIN, 1998). Além disso, algumas bactérias lácticas possuem atividade de hidrolisar

sais biliares. Os ácidos biliares desconjugados são menos solúveis em pH mais baixo (pH menor que 6,0) e precipitam, induzindo a uma co-precipitação do colesterol, que com ácidos biliares desconjugados pode tornar os ácidos biliares indisponíveis para reabsorção no fígado, sendo eliminado nas fezes, e desta forma, mais colesterol é requerido para síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo assim o nível de colesterol sérico (TAHRI; CROCIANI; SCHNEIDER, 1995).

Bifidobactérias são micro-organismos benéficos e existe um interesse na manutenção da predominância desse gênero na microbiota intestinal. Essas bactérias estão sendo amplamente utilizadas como probióticos e são alvos para substâncias prebióticas, principalmente devido à dificuldade de alteração da microbiota colônica por meio da introdução de micro-organismos exógenos (TESHIMA, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC), do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Parecer n° 209/2006).

#### 3.1 Micro-organismos

As cepas padrões de *Bifidobacterium* utilizadas como controle positivo neste estudo foram derivadas da coleção de culturas *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo elas: *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 e *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, e foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG – Brasil). As mesmas foram mantidas em Ágar MRS (*De Man, Rogosa and Sharp Agar* - Merck) sob refrigeração. Para uso, as cepas padrões foram ativadas em Caldo MRS (*De Man, Rogosa and Sharp Broth* - Merck) adicionado de 0,05% de cloridrato de L(+)-cisteína (Vetec) e incubadas em estufa bacteriológica (DeLeo), utilizando-se jarras de anaerobiose (Permutation), com geradores de dióxido de carbono (AnaeroGen – Oxoid) a 37°C por 24-48h.

A cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, pertencente ao laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC/CAL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Brasil), foi utilizada como controle negativo na identificação do gênero das bactérias isoladas e cultivada em caldo MRS, em aerobiose, a 37°C por 24-48h.

#### 3.2 Isolamento das Bifidobactérias

Amostras de fezes de três crianças de até 04 meses de idade, nascidas em Florianópolis, SC, Brasil, com dieta restrita ao leite materno e sem uso de antibióticos, foram coletadas a partir das fraldas, utilizando a técnica de *swab*. As amostras foram diluídas em água peptonada e plaqueadas por *plate*. O plaqueamento foi realizado em dois meios: Ágar RB (*Raffinose Bifidobacterium*

Ágar), segundo Hartemink et al. (1996) (Tabela 4) e Ágar LP-MRS (*Lithium chloride-sodium propionate, De Man, Rogosa and Sharp Agar*), conforme Vinderola; Reinheimer (1999) (Tabela 5). As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C, por 72 horas. As colônias selecionadas foram transferidas para caldo MRS e cultivadas a 37°C por 24-48 horas em anaerobiose, com posterior isolamento por esgotamento do inóculo em superfície de Ágar MRS, e incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e teste de catalase.

**Tabela 4** Composição do meio de cultivo ágar RB:

Componentes	g/L
Ágar bacteriológico	18,0
D(+)-rafinose	7,5
Caseinato de sódio	5,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de lítio	3,0
Propionato de sódio	15,0
L-cisteína.HCl	0,5
Tioglicolato de sódio	0,5
Solução de púrpura de bromocresol 1%	15,0
Solução de sais*	40,0

Fonte: Hartemink et al. (1996)

\*Solução de sais (g/L): MgSO<sub>4</sub> 0,2; CaCl<sub>2</sub> 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0; NaHCO<sub>3</sub> 10,0; NaCl 2,0  
pH final ajustado para 6,7 ± 0,1 com NaOH ou HCl 4N

**Tabela 5** Composição do meio de cultivo ágar LP :

Componentes	% w/v
Ágar MRS	100,0
Cloreto de lítio	0,2
Propionato de sódio	0,3

Fonte: Vinderola; Reinheimer (1999)

### 3.3 Determinação da enzima Frutose-6-fosfato-fosfocetolase (F6PPK)

Os isolados Gram-positivos e catalase negativos foram submetidos ao teste da enzima F6PPK, utilizando-se como controle positivo *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 e como controle negativo *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, de acordo com a metodologia modificada por Orban; Patterson (2000), visto que a presença dessa enzima caracteriza o gênero *Bifidobacterium*.

Culturas em 10 mL de caldo RCM (*Reinforced Clostridial Medium Broth - Oxoid*), incubadas *overnight*, a 37°C, foram centrifugadas a 10.000 x g, a 4°C, por 15 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com tampão fosfato (mistura 1:1 (v/v) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M e cisteína.HCl 500 mg/L, com pH ajustado para 6,5 com NaOH recentemente preparado) e ressuspensas em 1,0 mL do mesmo tampão. As células lavadas sofreram um pré-tratamento, onde ficaram incubadas em 0,4 mL de CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* - solução estoque de 450 µg/mL), por 5 minutos, para rompimento da parede celular. Após pré tratamento, foram adicionados 0,25 mL da solução contendo fluoreto de sódio (NaF, 3 mg/mL) e iodoacetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>INaO<sub>2</sub>, 5 mg/mL) em água, e 0,25 mL de frutose-6-fosfato de sódio (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>P.2H<sub>2</sub>O, 80mg/mL em água), misturadas e incubadas a 37°C por 30 minutos. A seguir, foi adicionado 1,5 mL de hidroxilamina.HCl (13g/100mL), misturada e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA, 15%, w/v), 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl 4N) e 1,0 mL de cloreto férrico (FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5% w/v em HCl 0,1N), os quais foram misturados e verificada a formação de cor. O aparecimento de cor violeta indica a presença de atividade da enzima F6PPK e a manutenção de cor amarela indica resultado negativo.

### **3.4 Identificação molecular das bifidobactérias isoladas**

#### **3.4.1 Extração do DNA**

Para a extração do DNA foram retirados 1,0 mL de cada cultivo em caldo MRS (36 horas a 37°C) das cepas isoladas, das cepas padrões de bifidobactérias (*Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 e *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 - controles positivos) e da cepa de *Lactobacillus plantarum* (controle negativo) e centrifugados a 13.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com água destilada deionizada para remover os inibidores da PCR. O DNA foi isolado usando o kit de purificação *Wizard Genomic DNA* (Promega) com adição de lisozima (10mg/mL), como recomendado para bactérias Gram positivas (DELCENSERIE et al., 2005).

### 3.4.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) específica para o gênero *Bifidobacterium sp*

As reações da PCR foram efetuadas com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (IDT), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP e 1,25 U de *Taq* DNA polymerase (Promega) em 1 x tampão PCR. Os pares de *primers* utilizados nas amplificações para identificação do gênero *Bifidobacterium* foram Bif164/Bif662 (KOK et al., 1996) and PbiR2/PbiF1 (ROY; SIROIS, 2000), sendo que para a identificação do *Lactobacillus plantarum*, utilizado como controle negativo, utilizou-se o par de *primer* Lpl/16F (BERTHIER; EHRLICH, 1998). As amplificações foram realizadas no Minicycler<sup>TM</sup> (MJ Research, Ind. Watertown, MA) ou um Mastercycler® gradient 5331 (Eppendorf AG, Hamburg). As condições da PCR estão listadas na Tabela 6.

**Tabela 6** Condições da PCR

Pares de primers	Desnaturação Inicial	Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
Bif164	95°C	30	95°C	55°C	72°C	72°C
Bif662	5 min		1 min	1 min	2 min	5 min
PbiR2	95°C	35	95°C	50°C	72°C	72°C
PbiF1	5 min		1 min	1 min	2 min	5 min
16	96°C	40	95°C	55°C	72°C	72°C
Lpl	3 min		30 s	1 min	30 s	5 min

Fontes: Kok et al.(1996); Roy; Sirois (2000); Berthier; Ehrlich (1998)

### 3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR (10  $\mu\text{L}$  da reação mais 2  $\mu\text{L}$  do tampão de carga) foram separados por eletroforese a 400 mA e 80 v por 50 min em gel de agarose 2,5%, 40 mL de tampão TBE 1x e corados com 2  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio. Para a visualização das bandas foi utilizado um transiluminador UV e as imagens foram fotografadas com câmera digital (Canon Poweshot A70).

### 3.4.4 Análise da restrição do DNA amplificado

Os produtos da PCR (*amplicons*) obtidos pelo uso dos *primers* Bif164/Bif662 (523 pb) e PbiR2/PbiF1 (914pb) foram utilizados para análise da restrição com as enzimas *Bam*HI, *Sau*3AI, *Taq*I, *Sau*96I e *Alu*I (Promega), segundo Krizová; Spanová; Rittich (2006). A reação de restrição apresentou 10U de cada enzima, 2  $\mu$ L do tampão correspondente e 10  $\mu$ L do produto da PCR, com volume final de 20  $\mu$ L. A digestão ocorreu durante 3 horas a 37°C ou 65°C, de acordo com a recomendação do fabricante da enzima. Os produtos da restrição foram separados em gel de agarose 2,5%, tampão TBE 1x e corados com brometo de etídio.

## 3.5 Verificação das características probióticas

### 3.5.1 Preparo dos Inóculos

Os inóculos foram preparados seguindo a metodologia de Teshima (2001), com algumas modificações. As cepas identificadas como sendo pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* foram reativadas em 10 mL de caldo MRS. As culturas foram centrifugadas a 2.750 x g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os concentrados de células ressuspensos em 5,0 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,2) para lavagem das células. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, e por fim, aos concentrados acrescentou-se 10,0 mL de caldo MRS para a padronização do inóculo. Foram realizadas contagens de células viáveis visando obter um inóculo com aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL para posterior uso nos testes de resistência à bile e ao suco gástrico.

### 3.5.2 Resistência à bile

A determinação da resistência à bile das bifidobactérias isoladas foi realizada em triplicata, seguindo a técnica descrita por Lin; Savaiano; Harlander (1991), com alterações. Após reativação, 1,0 mL das culturas foram inoculadas em 10,0 mL caldo MRS adicionado de 0,3% de bile (*Oxgall* - Difco) e incubadas por 6 horas a 37°C, em

anaerobiose. Após este período, foi determinada a contagem de células viáveis. Paralelamente foi determinada a contagem de um cultivo controle, inoculado e incubado sob as mesmas condições, porém isento de bile.

### **3.5.3 Resistência ao suco gástrico**

As culturas isoladas (1,0 mL) foram inoculadas em 10,0 mL de suco gástrico artificial. O mesmo foi formulado segundo Newmann; Ferreira (1995), apresentando os seguintes componentes: 2,0 g de cloreto de sódio, 3,2 g de pepsina, 7,0 mL de ácido clorídrico concentrado e 1000 mL de água destilada, com pH final igual a 2,0, e esterilizado a frio em membranas *Millipore* de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As amostras de suco gástrico inoculadas foram mantidas a 37°C, em anaerobiose, e a contagem de células viáveis foi realizada em ágar MRS após passados 90 e 180 minutos de incubação. A experimentação foi repetida três vezes.

### **3.6 Perfil de fermentação dos carboidratos**

O perfil de fermentação de açúcares das cepas isoladas foi realizado em kit API CH 50 (BioMerieux), conforme indicação do fabricante. Os resultados foram analisados de acordo com Mitsuoka; Kaneucki (1977), Scardovi (1986) e Sgorbati; Biavati; Palenzona (1995).

### **3.7 Características Tecnológicas das Bifidobactérias Isoladas**

#### **3.7.1 Tolerância à acidez**

De acordo com Mlobeli; Gutierrez; Maddox (1998), foi preparado um meio contendo triptona (10 g L<sup>-1</sup>), água peptonada (5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5 g L<sup>-1</sup>), Tween 80 (0,5 g L<sup>-1</sup> g L<sup>-1</sup>), NaCl (4,5 g L<sup>-1</sup>), KCl (g L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,15 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 g L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (1,0 g L<sup>-1</sup>), L-cisteína.HCl (1,2 g L<sup>-1</sup>) e glicose (50 g L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado com HCl ou NaOH para o valor de 4,5 ( $\pm$  0,2). O meio foi distribuído em tubos de ensaio (10 mL) e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, foram inoculados com 1,0 mL da cultura de cada bifidobactéria isolada



(I6, I17 e I20), com concentrações de aproximadamente  $10^9$  UFC/mL, incubados em anaerobiose, a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata. A viabilidade das bifidobactérias foi verificada por contagem em ágar LP-MRS.

### **3.7.2 Exposição ao oxigênio**

O método adotado para verificar a resistência das bifidobactérias isoladas ao oxigênio foi o realizado de acordo com Beerens; Gavini; Neut (2000), com modificações. Placas de Petri contendo 20 mL de Ágar Colúmbia (Merck) foram preparadas e inoculadas com 1,0 mL das culturas isoladas de 24 horas em caldo MRS contendo entre  $10^6$  a  $10^8$  células/mL (em triplicata). Após a inversão, 0,5 mL de água destilada estéril foi adicionada na tampa de cada placa. As placas foram divididas em dois grupos, sendo que o primeiro foi colocado em jarra de anaerobiose com sistema gerador de gás apropriado e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas. O segundo grupo foi colocado na estufa sem restrições de ar e mantido a  $20^\circ\text{C}$ . Após 4 dias, as placas foram incubadas anaerobicamente a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas. Posteriormente, foram realizadas contagens das colônias obtidas de cada diluição em ambos os grupos. Contagens próximas entre os grupos demonstrou resistência à exposição ao ar.

### **3.7.3 Influência de ingredientes e aditivos alimentares**

#### **3.7.3.1 Viabilidade de crescimento em leite**

O leite desnatado e esterilizado foi adquirido no mercado local. Foram preparados tubos de ensaio contendo 10,0 mL do leite desnatado e esterilizado, adicionado de 1,0 mL de cada bifidobactéria isolada (I6, I17 e I20 em concentrações com aproximadamente  $10^9$  UFC/mL). As amostras foram devidamente etiquetadas e mantidas em estufas a  $37^\circ\text{C}$ , em anaerobiose, por 24 horas. As análises foram feitas em triplicata e a viabilidade celular foi verificada por contagem em meio ágar LP-MRS.

### **3.7.3.2 Viabilidade de crescimento em extrato de soja**

A viabilidade de crescimento das bifidobactérias isoladas (I6, I17 e I20) em extrato de soja foi verificada segundo Fuchs et al. (2005), com adaptações. O extrato de soja em pó, adquirido no comércio local, foi homogeneizado com água destilada, na concentração de 10% (m/v), em liquidificador, durante 5 minutos. O homogeneizado foi distribuído em tubos de ensaio (10,0 mL) e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento até a temperatura de 37°C, o inóculo de 10% (contendo aproximadamente  $10^9$  UFC/mL) de cada cultura das bifidobactérias foi adicionado aos tubos de ensaio e incubados em anaerobiose a 37°C por 24 horas, em triplicata. A contagem de células viáveis das bifidobactérias foi realizada em ágar LP-MRS.

### **3.7.3.3 Viabilidade de crescimento em soro de queijo**

#### **3.7.3.3.1 Obtenção do soro de queijo**

O leite (1000 mL) foi submetido a uma coagulação enzimática pela adição do coalho (Chr. Hansen) na proporção de 0,9 mL/L de leite e adição de uma solução de cloreto de cálcio 40% (0,4 mL/L de leite), com incubação a 37°C durante 40 minutos. Após este período, foi realizada a quebra da coalhada e o dessoramento da mesma, obtendo-se o soro de queijo (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). O soro sofreu pasteurização lenta (63°C por 30 minutos), seguida de resfriamento a 10°C, e foi mantido sob refrigeração (4°C).

#### **3.7.3.3.2 Adição das bifidobactérias ao soro**

As bifidobactérias isoladas (I6, I17 e I20) foram ativadas em caldo MRS suplementado com 0,05% de cisteína.HCl. Baseando-se em Oliveira et al. (2001), após a ativação, 1,0 mL de cada cepa (concentração aproximada de  $10^9$  UFC/mL) foi incorporada em tubos contendo 10,0 mL de soro de queijo. Os frascos foram

incubados a 37°C, em anaerobiose, por 24 horas. A contagem das bifidobactérias foi realizada em meio ágar LP-MRS.

#### **3.7.3.4 Viabilidade de crescimento junto às bactérias do iogurte**

I6, I17 e I20, as bifidobactérias isoladas, foram previamente ativadas em caldo MRS suplementado com 0,05% de cisteína.HCl, a 37°C, por 24 horas, em anaerobiose. Cultura do iogurte RICH (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*) foi ativada conforme indicação do fabricante (Christian Hansen, Valinhos-SP). Após a ativação, em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de caldo MRS, foram inoculadas 1,0 mL da bifidobactéria isolada mais 1,0 mL da cultura do iogurte, nas concentrações de aproximadamente  $10^9$  UFC/mL. Os tubos foram incubados a 37°C, em anaerobiose, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata e a contagem das bifidobactérias foi realizada em meio ágar LP-MRS.

#### **3.7.3.5 Influência dos aditivos**

Para verificar a influência dos aditivos identificados na Tabela 7 no crescimento das cepas isoladas, foi utilizada a metodologia descrita por Vinderola et al. (2002). Os aditivos foram recebidos por doação de diferentes empresas brasileiras ou filiadas no Brasil. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de uma cultura cultivada em caldo MRS (concentração aproximada de  $10^9$  UFC/mL), por 24 horas, a 37°C e inoculadas em tubos contendo 10,0 mL de caldo MRS mais o aditivo. As concentrações dos aditivos para os testes foram determinadas dentro do permitido pela legislação brasileira para leites fermentados, bebidas lácteas e queijos. Para a interpretação dos resultados não se adotou o procedimento proposto pelos autores, visto que usaram como parâmetro de análise somente as absorvâncias (dados que não foram divulgados), sem correlacionar com o crescimento microbiano em cada meio testado. Desta forma, após a incubação das amostras a 37°C, por 24 horas, para verificar a viabilidade celular nos meios com os aditivos foram realizadas as contagens das bifidobactérias em ágar LP-MRS. Paralelamente, foram realizadas

contagens nos meios controles (sem adição do aditivo). A experimentação foi realizada em triplicata.

**Tabela 7.** Aditivos alimentares testados

<b>Aditivos</b>	<b>Concentrações</b>
Sal:	
NaCl	1%; 2%
Açúcares:	
Sacarose	8%; 12%
Lactose	8%; 12%
Adoçantes:	
Acesulfame	0,035 g/100g
Aspartame	0,075 g/100g
Ciclamato	0,13 g/100g
Sacarina	0,03 g/100g
Corantes naturais:	
Carmin	100 mg/kg
Vermelho Ponceau	50 mg/kg
Cúrcuma	80 mg/kg
Flavorizantes:	
Pêssego	0,5%*
Morango	
Baunilha	
Polpas:	
Pêssego	5%
Morango	5%
Espessantes/estabilizantes:	
Goma xantana	5 g/kg
Goma guar	5 g/kg
Amido de milho	1%
Amido de milho modificado	1%
Conservantes:	
Nisina	12,5 mg/kg
Lisozima	25 mg/L de leite
Sorbato de potássio	1000 mg/kg

\*De acordo com as recomendações do fabricante

### 3.7.3.6 Análise Estatística

Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) para determinar diferenças entre as médias ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa STATISTICA Versão 6.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento das Bifidobactérias

De cada amostra de fezes, foram isoladas cerca de 30 (trinta) colônias de ambos os meios ágar RB (*Raffinose Bifidobacterium Agar*) e ágar LP-MRS (*Lithium Chloride-Sodium Propionate, De Man, Rogosa and Sharp Agar*).

Esses meios foram selecionados após a realização de testes com outros meios: meio BFM (NEBRA; BLANCH, 1999), meio Beerens (BEERENS, 1990) e meio BL-OG (LIM; HUH; BAEK, 1995), que se mostraram mais onerosos, trabalhosos e de difícil visualização da colônia.

Os meios ágar RB e ágar LP-MRS, segundo seus autores, foram praticamente seletivos para o isolamento de bifidobactérias, sendo que no meio RB não houve o crescimento de espécies não bífidas (exceto uma cepa de actinomicetos) (HARTEMINK et al., 1996), e no meio LP-MRS houve inibição do crescimento de lactobacilos e da maioria dos estreptococos e lactococos (LAPIERRE; UNDELAND; COX, 1992).

Meios contendo antibióticos na composição não foram adotados devido ao custo elevado e demora no preparo, assim como o meio NPNL (TERAGUCHI et al., citados por LAROIA; MARTIN, 1991), normalmente usado como referência. Além disso, Teshima (2001) verificou que o meio NPNL permitiu o crescimento de outros gêneros bacterianos, apesar de ser considerado seletivo para o isolamento de bifidobactérias (LAROIA.; MARTIN, 1991; HARTEMINK et al., 1996). Ainda, na microbiota intestinal de recém nascidos existe uma grande variação intraespecífica da resistência de bifidobactérias a antibióticos (LIM; HUH; BAEK, 1993; CHARTERIS et al., 1998), permitindo assim somente o isolamento no meio NPNL das cepas resistentes a esses antibióticos.

O ágar RB além de propiciar o crescimento diferenciado de bifidobactérias, restringe o crescimento de micro-organismos incapazes de fermentar rafinose. Entre as espécies de bifidobactérias de origem humana, apenas uma cepa de

*Bifidobacterium longum* não apresentou crescimento típico neste meio, uma vez que a grande maioria das estirpes dessa espécie não fermenta a rafinose (HARTEMINK et al., 1996). Porém, no meio ágar LP-MRS, adotado por Vinderola; Reinheimer (1999), não foi constatado em sua composição nenhum fator inibitório de crescimento dessa espécie.

Do meio ágar RB foram selecionadas colônias amarelas, com halo opaco de precipitação e de tamanho maior que 3 mm de diâmetro, de acordo com a descrição de Hartemink et al. (1996). No meio ágar LP-MRS, selecionou-se colônias pequenas, redondas e de coloração creme (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e teste da catalase, onde 72 (setenta e duas) apresentaram-se como bacilos Gram-positivos e catalase negativos, correspondendo às características das bifidobactérias descritas por Scardovi (1986).

#### **4.2 Determinação da presença da enzima frutose-6-fosfato-fosfocetolase (F6PPK)**

Os 72 bacilos Gram-positivos e catalase-negativos foram submetidos ao teste para determinar a presença da enzima F6PPK, visto que outros gêneros, os quais também podem ser isolados de fezes de lactentes, como *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* ou *Propionibacterium*, podem apresentar as mesmas características, porém o gênero *Bifidobacterium* é o único de origem intestinal que possui a enzima F6PPK (MODLER; McKELLAR; YAGUCHI, 1990).

O teste não molecular mais confiável para identificação de bifidobactérias é o da atividade da enzima frutose-6-fosfato-fosfocetolase, sendo descrito por Scardovi; Trovatelli (1965), citados por Orban; Patterson (2000), onde o rompimento das células é feito por sonicação a fim de liberar os extratos celulares para o ensaio, e as culturas são identificadas como sendo do gênero *Bifidobacterium* pela formação de cor violeta. Porém, o teste realizado foi o sugerido por Orban; Patterson (2000), onde o sonicador foi substituído pelo composto químico CTAB, para o rompimento da parede celular, o que consumiu menor tempo de análise.

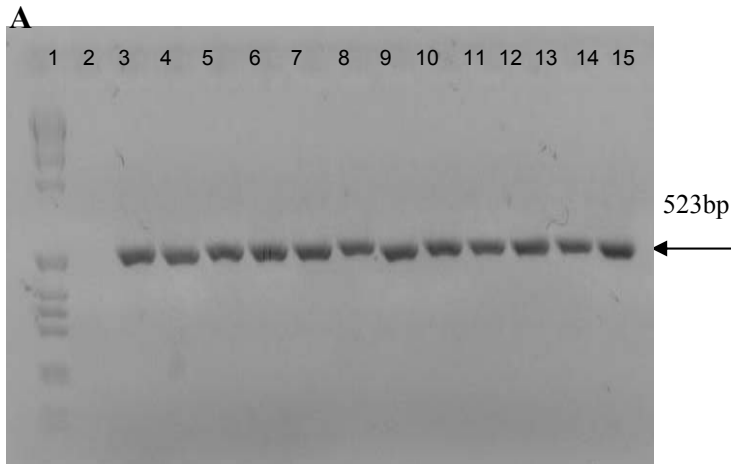
Dos 72 bacilos analisados, apenas 30 apresentaram reação positiva para a presença da enzima F6PPK, indicando que estes pertenciam ao gênero *Bifidobacterium*.

### 4.3 Identificação molecular das bifidobactérias

O DNA das 30 cepas isoladas e das cepas ATCC *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* e *L. plantarum* foi extraído em triplicata, e foram submetidas à PCR gênero específica. Três das trinta cepas isoladas e três cepas padrões de *Bifidobacterium* apresentaram fragmentos de 523 pb esperados com o uso do par de *primers* Bif164/Bif662 e fragmentos de 914 pb esperados para o par de *primers* PbiF1/PbiR2, confirmando que estas três novas cepas isoladas (I6, I17 e I20) pertenciam ao gênero *Bifidobacterium*. Os produtos da PCR não foram observados para a cepa de *L. plantarum* ATCC 8014, usada como controle negativo (Figura 1A).

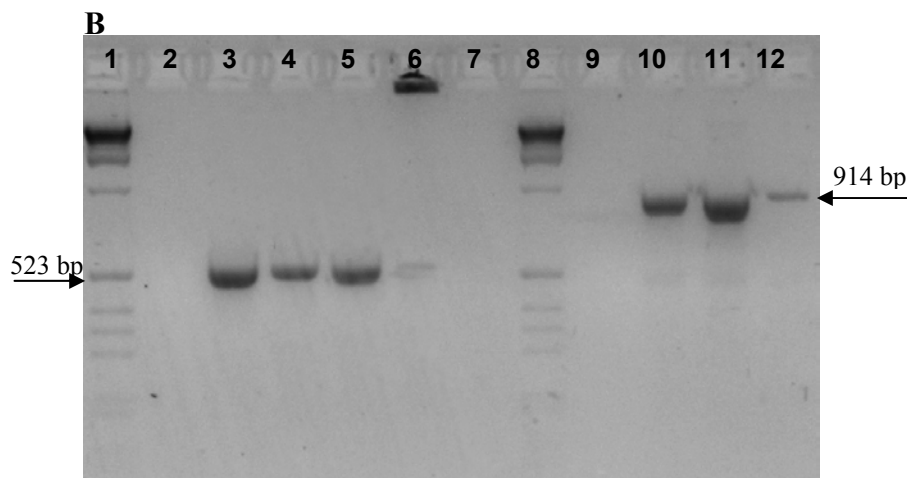
Nenhum produto da PCR foi observado pelas cepas isoladas e pelas cepas padrões de *Bifidobacterium* submetidas a PCR usando o *primer* 16/Lpl espécie-específico para *L. plantarum* (dados não apresentados).

A digestão dos produtos da PCR amplificados usando o par de *primers* Bif164/Bif662 pela enzima *AluI* foi realizada e foi possível observar o mesmo perfil para todas as amostras isoladas e cepas padrões (Figura 1C). Esta enzima não foi útil para a diferenciação entre espécies específicas. O *amplicon* da cepa padrão de *B. bifidum* não foi digerido quando a enzima *BamHI* foi usada para a digestão dos produtos da PCR obtidos com os *primers* Bif164/Bif662 and PbiF1/PbiR2, estando de acordo com os resultados obtidos por Krizová; Spanová; Rittich (2006) e é útil para diferenciar *B. bifidum* de outras duas cepas padrões ATCC. A digestão dos dois novos isolados I17 e I20 diferiram de *B. bifidum* e foram similares a *B. longum* e *B. breve* (Figura 1C).



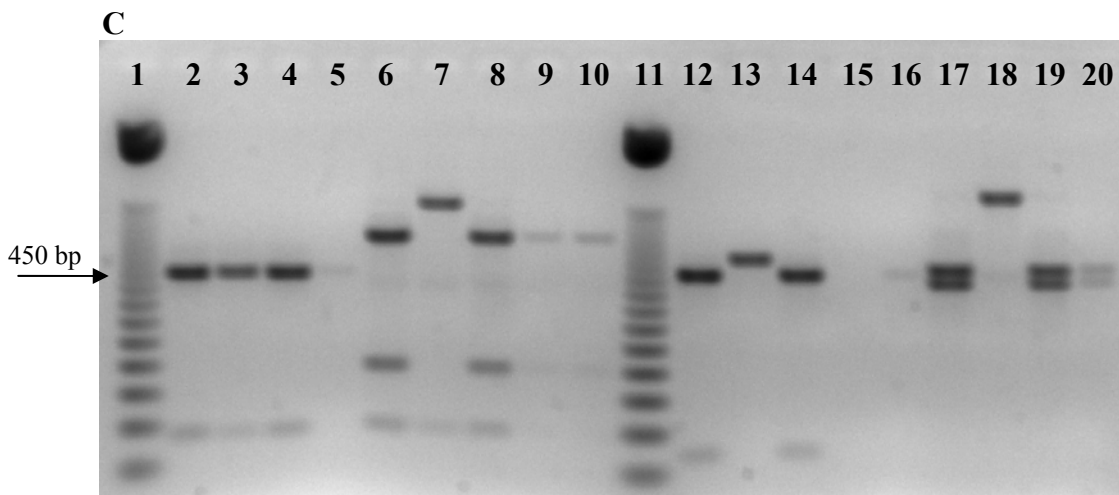
**Figura 1A.** PCR para identificação do gênero *Bifidobacterium* usando *primers* Bif164/Bif662. 1: *ladder* 1Kb; 2: água; 3: *B. longum* ATCC 15707; 4: isolado B1\*; 5: *B. bifidum* ATCC 29521; 6: *B. breve* ATCC 15700; 7: isolado I6; 8: isolado B3\*; 9: isolado B1\*; 10: *B. bifidum* ATCC 29521; 11: *B. breve* ATCC 15700; 12: *B. longum* ATCC15707; 13: *B. bifidum* ATCC 29521; 14: isolado I17, 15: *L. plantarum* .

\*Cepas isoladas na Universidade Federal de Minas Gerais: B1= *B. animalis* subsp. *lactis* e B3= *B. adolescentis*

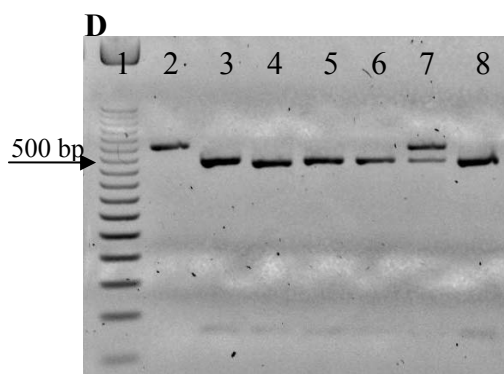


**Figura 1B.** PCR para identificação do gênero *Bifidobacterium* usando *primers* Bif164/Bif662 (2-6) e *primers* PbiF1/PbiR2 (8-12). 1: *ladder* 1 Kb; 2: água; 3: *B. longum* ATCC 15707; 4: *B. bifidum* ATCC 29521; 5: *B. breve* ATCC 15700; 6: isolado I20; 7: gap; 8: *ladder* 1Kb; 9: água; 10: *B. longum* ATCC15707; 11: *B. bifidum* ATCC 29521; 12: *B. breve* ATCC 15700; 13: isolado I20.





**Figura 1C.** ARDRA *AluI* após amplificação com Bif164/Bif662 (1-5): 1: *ladder* 50 pb; 2: *B. longum* ATCC15707; 3: *B. bifidum* ATCC 29521; 4: *B. breve* ATCC 15700; 5: isolado I20. ARDRA *AluI* após amplificação com PbiF1/PbiR2 (6-10): 6: *B. longum* ATCC 15707; 7: *B. bifidum* ATCC 29521; 8: *B. breve* ATCC 15700; 9-10: isolado I20. ARDRA *Bam*HI após amplificação com Bif164/Bif662 (11-16): 11: *ladder* 50 pb; 12: *B. longum* ATCC 15707; 13: *B. bifidum* ATCC 29521; 14: *B. breve* ATCC 15700; 15: isolado I20, 16: isolado I17; ARDRA *Bam*HI após amplificação com PbiF1/PbiR2 (17-20): 17: *B. longum* ATCC 15707; 18: *B. bifidum* ATCC 29521; 19: *B. breve* ATCC 15700; 20: isolado I20.



**Figura 1D:** ARDRA *Bam*HI após amplificação com Bif164/Bif662. 1: *ladder* 50 pb; 2: isolado B1\*; 3: *B. longum* ATCC 15707; 4: isolado B3\* ; 5: *B. bifidum* ATCC 29521; 6: *B. breve* ATCC 15700; 7: isolado I6; 8: isolado I17.

\*Cepas isoladas na Universidade Federal de Minas Gerais: B1= *B. animalis* subsp. *lactis* e B3= *B. adolescentis*

Um método baseado na PCR foi desenvolvido por Venema; Maathuis (2003) para a identificação de isolados de *Bifidobacterium* a nível de espécie. Usando dois *primers* específicos para *Bifidobacterium* direcionados para o gene 16S ribossômico

(Bif164 e Bif662), produto da PCR foi obtido de 12 diferentes espécies bífidas isoladas do trato gastrointestinal humano.

Ventura et al. (2001), utilizaram a técnica do ARDRA, com duas enzimas de restrição (*Sau3AI* e *BamHI*) para a identificação de bifidobactérias isoladas de diferentes meios.

Krizová; Spanová; Rittich (2006), identificaram dezesseis cepas como sendo do gênero *Bifidobacterium* por meio de PCR com dois diferentes pares de *primers*, PBiF1/PbiR2 e Bif164/Bif662. Para a identificação das espécies usaram a técnica da ARDRA, com seis diferentes enzimas de restrição: *BamHI*, *Sau3AI*, *TaqI*, *Sau961*, *AluI* e *NciI*.

#### **4.4 Verificação das características probióticas**

##### **4.4.1 Resistência à bile**

As 30 cepas que demonstraram atividade para a enzima F6PPK foram submetidas ao teste com *Oxgall* para verificar sua resistência a esta barreira fisiológica, onde foi verificado que todas podiam ser consideradas resistentes.

Segundo Reis et al. (1998), na seleção de lactobacilos resistentes à bile, é considerada resistente uma cultura que apresenta um crescimento na presença de *Oxgall*, igual ou superior a 20% do crescimento obtido no controle.

O crescimento dos isolados, que por meio de técnicas moleculares foram confirmados pertencerem ao gênero *Bifidobacterium*, no meio controle (MRS) e na presença de bile (MRS adicionado de 0,3% de *Oxgall*) foi verificado pela contagem nos tempos zero e 6 horas após incubação (Anexo 1 - Tabela 9 e Figura 2).

Os três isolados de bifidobactérias (I6, I17 e I20) apresentaram contagem inicial (tempo zero) de  $2,1 \times 10^8$  UFC/mL,  $1,9 \times 10^8$  UFC/mL e  $1,7 \times 10^8$  UFC/mL e

contagem final (após 6 horas) de  $2,7 \times 10^8$  UFC/mL,  $2,2 \times 10^8$  UFC/mL e  $1,9 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente.

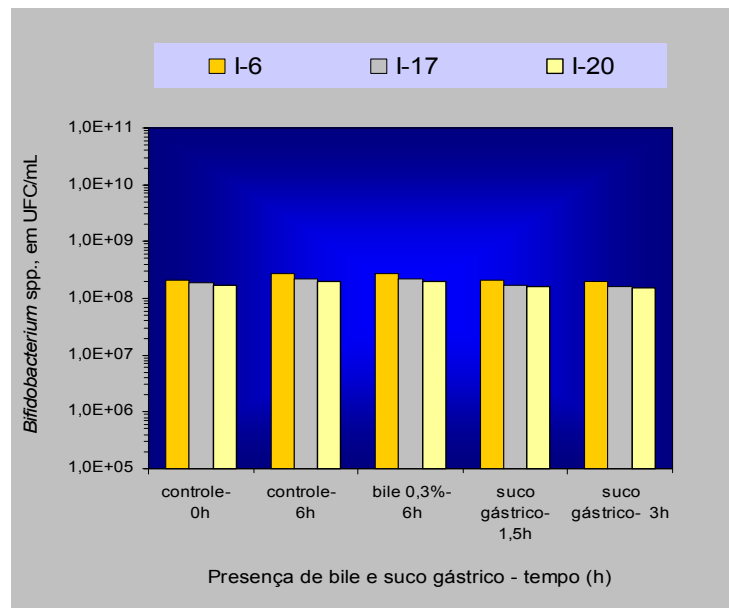
Os resultados demonstraram que o crescimento das bifidobactérias isoladas na presença de bile foi levemente superior ao do meio controle (sem bile), atendendo ao proposto por Reis et al. (1998) e indicando que essas bifidobactérias atendem a este requisito para ser um micro-organismo probiótico.

Vernazza; Gibson; Rastall (2006), verificaram que *B. lactis* Bb12 e *B. infantis* 20088 cresceram em meio contendo bile como demonstrado pela alta contagem em UFC/mL, apesar da medida de absorvância não ter refletido tal resultado. Isto pode ser explicado por Zavaglia et al. (2002) que encontrou que culturas expostas à bile, tem a membrana celular alterada, causando autoagregação e efeito de floculação.

#### **4.4.2 Resistência ao suco gástrico**

As 30 cepas que demonstraram atividade para a enzima F6PPK também foram submetidas ao teste de resistência ao suco gástrico, a fim de verificar sua capacidade de resistir ao pH baixo do estômago, alcançando o intestino de forma viável, sendo constatado que todas as cepas testadas resistiram ao pH 2,0.

As cepas isoladas I6, I17 e I20 de bifidobactérias mantiveram-se viáveis após serem submetidas ao meio gástrico simulado (pH 2,0), durante 90 e 180 min, demonstrando serem capazes de ultrapassarem mais essa barreira biológica. As médias das contagens em UFC/mL encontram-se no Anexo 1 - Tabela 10 e na Figura 2.



**Figura 2** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença da bile 0,3% (6 h) e na presença do suco gástrico simulado (1,5h e 3h).

A avaliação da tolerância ao ácido estomacal é um dos critérios gerais aplicados durante a seleção de cepas potencialmente probióticas para garantir sua viabilidade e funcionalidade (FAO/WHO, 2002, citado por SANZ, 2007).

Sistemas *in vitro* têm sido preferencialmente usados em um primeiro passo para avaliação de novas cepas probióticas, incluindo incubações controladas em sucos gástricos reais ou simulados (pH 2,0 a 4,0; 70 a 180 minutos) (CHARTERIS et al., 1998a).

Bifidobactérias tem mostrado ser altamente sensíveis a valores baixos de pH, embora a tolerância ao ácido varie grandemente dependendo das espécies e das cepas. A maioria das cepas das espécies *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. breve* e *B. adolescentis* avaliada por Charteris et al. (1998a) não mostraram resistência específica às condições do suco gástrico simulado (pH 2,0 por 90 minutos).

Takahashi et al. (2004), relataram que a tolerância ao suco gástrico artificial é cepa-dependente e que a maioria das cepas estudadas exibiram razão de sobrevivência menor que 1%, com exceção de uma cepa de *B. longum* que mostrou

uma razão de sobrevivência de 25% após incubação a pH 3,0 por 2 horas. Matsumoto; Ohishi; Benno (2004) indicaram que células das cepas das espécies *B. longum*, *B. adolescentis* e *B. pseudocatenulatum* decresceram após 1 hora de incubação a pH 3,0. A única exceção foi uma cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* que sobreviveu à exposição a pH 3,0-5,0 por 3 horas; contudo, a viabilidade da cepa a pH 2,0 começou a decrescer após 1 hora.

Mainville; Arcand; Farnworth (2005), indicaram que a resistência ao ácido das cepas de *B. animalis* foi notavelmente maior do que de *B. infantis* e *B. longum*. Segundo Mattö et al. (2006), cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* apresentaram boa sobrevivência à faixa de valores de pH de 2,0-3,0, enquanto que cepas de *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* e *B. longum* exibiram fraca sobrevivência.

A resistência ao ácido de cepas de *Bifidobacterium* isoladas de fezes de adultos e de bebês foram estudadas por Collado et al. (2006), constatando que somente 40-50% foram intrinsecamente resistentes às condições de suco gástrico simulado e mantiveram níveis de  $10^6$  UFC/mL após 90 minutos de incubação a pH 2,0.

Estudos recentes verificaram que as bifidobactérias foram mais sensíveis ao pH 2,0 quando o meio foi acidificado exclusivamente com HCl, do que quando foi acidificado com a combinação de pepsina e HCl, os quais simulam melhor a composição do suco gástrico. Estes resultados indicam que a pepsina pode proteger as células de bifidobactérias durante a exposição ao pH baixo por decréscimo da hiperpolarização das células, sugerindo estar associado com a atividade  $H^+$ -ATPase (MATTÖ et al., 2006).

As bifidobactérias isoladas de bebês parecem ser mais adaptadas às condições do trato gastrointestinal do que aquelas isoladas de adultos. *B. breve* e *B. adolescentis* foram espécies de origem infantil e adulta, respectivamente, que mostraram elevada habilidade para se adaptar ao pH ácido (COLLADO; SANZ, 2006).

#### 4.5 Perfil de fermentação dos carboidratos

O teste para verificar o perfil de fermentação de carboidratos das três cepas de bifidobactérias isoladas, foi realizado com intuito de verificar o comportamento das cepas isoladas frente a possíveis carboidratos que possam estar presentes nos meios de cultura e/ou nos alimentos. O resultado está apresentado na Tabela 8.

As três cepas isoladas apresentaram perfil de fermentação dos carboidratos muito aproximadas, sendo que todas fermentaram ribose, galactose, glicose, frutose, manose, manitol, sorbitol, esculina, salicina, maltose, lactose, melibiose, sacarose, rafinose e turanose.

**Tabela 8** Perfil de fermentação de carboidratos das cepas de *Bifidobacterium* isoladas após 72h de incubação, em Kit API CHL:

Carboidratos	Isolados		
	I-6	I-17	I-20
1- Glicerol	-	-	-
2- Eritritol	-	-	-
3- D-Arabinose	-	-	-
4- L-Arabinose	-	-	-
5- Ribose	+	+s	+
6- D-Xilose	-	-	-
7- L-Xilose	-	-	-
8- Adonitol	-	-	-
9- $\beta$ -Metil-Xilosídeo	-	-	-
10- Galactose	+	+	+
11- D-Glicose	+	+	+
12- D-Frutose	+	+	+
13- D-Manose	+	+	+
14- L-Sorbose	-	-	-
15- Ramnose	-	-	-
16- Dulcitol	-	-	-
17- Inositol	-	-	-
18- Manitol	+	+	+
19- Sorbitol	+	+	+
20- $\alpha$ -Metil D-Manosídeo	-	-	-
21- $\alpha$ -Metil D-Glicosídeo	+	-	-
22- N-Acetil-Glicosamina	(+)	+s	+
23- Amidalina	+	+s	-
24- Arbutina	-	-	-
25- Esculina	+	+	+
26- Salicina	+	+	+

27- Celobiose	+	+s	-
28- Maltose	+	+	+
29- Lactose	+	+	+
30- Melibiose	+	+	+
31- Sacarose	+	+	+
32- Trealose	-	-	-
33- Inulina	-	-	-
34- Melezitose	-	-	-
35- D-Rafinose	+	+	+
36- Amido	-	-	-
37- Glicogênio	-	+	+
38- Xilitol	-	-	-
39- $\beta$ -Gentibiose	-	-	-
40- D-Turanose	+	+	+
41- L-Lixose	-	-	-
42- D-Tagatose	-	-	-
43- D-Fucose	-	-	-
44- L-Fucose	+	-	-
45- D-Arabitól	-	-	-
46- L-Arabitól	-	-	-
47- Gluconato	-	-	-
48- 2-Ceto-Gluconato	-	-	-
49- 5-Ceto-Gluconato	-	-	-

+: reação positiva; -: reação negativa; (+): reação fracamente positiva; +s: reação lentamente positiva

Estudos sobre utilização de carboidratos por bifidobactérias mostraram que cepas individuais têm preferência por substratos específicos (DEGNAN; MACFARLANE, 1991), onde oito diferentes espécies foram cultivadas em várias misturas de arabinose, manose, galactose, glicose e xilose. *Bifidobacterium bifidum* utilizou os carboidratos na seguinte ordem: glicose > galactose > manose, com inibição da captação da pentose. *Bifidobacterium longum* utilizou glicose e xilose, enquanto que a assimilação de galactose foi reprimida. Em *Bifidobacterium catenulatum*, a glicose reprimiu a captação da galactose. Glicose e galactose foram assimiladas simultaneamente por *Bifidobacterium adolescentis*, com a utilização de manose e arabinose sendo reprimidas. Glicose e galactose também foram os substratos preferidos por *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium angulatum*, considerando que a sequência de captação de açúcar onde galactose > glicose > xilose foi observada para *Bifidobacterium pseudolongum*. Inversamente, glicose e arabinose foram utilizadas por *Bifidobacterium breve*, enquanto a captação de manose foi reprimida.

Hopkins; Cummings; Macfarlane (1998), compararam o crescimento de várias cepas de bifidobactérias sobre uma gama de substratos oligossacarídeos. Os resultados mostraram que, como com a utilização dos monossacarídeos, existem diferenças entre as espécies nas suas capacidades para utilizar essas substâncias. GOS e oligofrutose demonstraram ser melhor fonte de crescimento para a bactéria teste, enquanto que pirodextrinas e xilo-oligossacarídeos foram substratos fracos para as cepas testadas. O crescimento demonstrou ser melhor na presença de oligossacarídeos em comparação com seus componentes monossacarídeos.

O leite materno contém mais de 130 tipos de oligossacarídeos, compostos por cinco monossacarídeos residuais (ácido siálico, N-acetilglicosamina, fucose, glicose e galactose), em cadeias de 3 a 11 unidades (KOLETZKO et al., 1998). A capacidade de degradar estes oligossacarídeos, considerados fatores bifidogênicos, possibilita uma maior colonização do trato intestinal por bifidobactérias.

Experimentos realizados por Mlobeli; Gutierrez; Maddox (1998) analisaram a fisiologia e cinética de crescimento de *Bifidobacterium bifidum* na presença de diferentes açúcares (glicose, lactose, celobiose, lactulose, maltose e rafinose). Glicose e maltose foram os açúcares preferidos por *B. bifidum* em termos de razão de crescimento e produção de biomassa, enquanto que na presença da lactose houve menor produção de biomassa, apesar da elevada razão de crescimento inicial. Com rafinose no meio, *B. bifidum* demonstrou crescimento relativamente rápido, mas com celobiose e lactulose obteve crescimento fraco.

Martínez-Villaluenga; Gomes (2007), analisaram o comportamento das cepas de *B. lactis* Bb12, *B. longum* Bb46, *B. bifidum* C-1, *B. bifidum* C-2, *B. lactis* C-3 e *B. breve* C-4 tendo como fonte de carbono no meio MRS oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) em diferentes concentrações (0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0% p/v) e contendo púrpura de bromocresol como indicador da produção de ácido. *B. lactis* Bb12 e *B. longum* Bb46 foram as mais ativas na presença dos oligossacarídeos, mudando a cor do meio em concentrações maiores ou iguais a 0,1% de RFOs após 8 horas de incubação; entretanto, *B. lactis* C-3 requereu mais que 2,0% do



carboidrato para produzir efeito similar. *B. bifidum* C-1 e *B. bifidum* C-2 não fermentaram RFOs.

Considerando ainda, que o perfil de fermentação de carboidratos permite a identificação fenotípica das espécies bacterianas, as três cepas isoladas poderiam ser caracterizadas como pertencentes à espécie *Bifidobacterium breve*, de acordo com Mitsuoka; Kaneuchi (1977), Scardovi (1986) e Sgorbati; Biavati; Palenzona (1995). Iwata; Morishita (1989), analisaram a fermentação de cinco cepas de *B. breve*, em comparação com *B. breve* ATCC 15700, destacando que diferenças de resultados podem ser devido a diferenças na origem dos *B. breve* isolados.

Mitsuoka; Kaneucki (1977), verificaram que as bifidobactérias mais predominantes na microbiota de crianças foram as espécies *B. bifidum* tipo b, *B. infantis* subsp. *infantis*, *B. breve* subsp. *breve*, *B. breve* subsp. *parvulorum* e *B. longum* subsp. *longum* tipo b. Em estudo posterior, Mitsuoka (1982) citado por Mitsuoka (1990) confirmou a predominância de *B. breve* e *B. infantis* na microbiota de recém nascidos.

Em outra pesquisa, Bezirtzoglou (1997), constatou que *B. bifidum* foi a espécie mais frequentemente isolada de recém nascidos alimentados exclusivamente com leite materno.

Teshima (2001), isolou bifidobactérias de fezes de recém nascidos e identificou-as fenotípica e genotipicamente, concluindo que os catorze isolados pertenciam à espécie *B. breve*.

## **4.6 Características tecnológicas das bifidobactérias**

### **4.6.1 Tolerância à acidez**

O experimento foi realizado em um meio formulado, nutricionalmente complexo, visando simular as condições encontradas nos alimentos e/ou nos possíveis meios industriais utilizados para a produção comercial de bifidobactérias.

O pH adotado ( $4,5 \pm 0,2$ ) para verificar a resistência das bifidobactérias isoladas no meio ácido foi escolhido por se tratar do pH comumente encontrado em produtos lácteos fermentados.

As bifidobactérias isoladas do trato intestinal de bebês, I6, I17 e I20 demonstraram resistência ao pH 4,5. As isoladas I6 e I17 não apresentaram redução no número de células viáveis ao final das 24 horas de incubação. Porém, I20 apresentou redução de  $3,1 \times 10^8$  UFC/mL para  $3,5 \times 10^7$  UFC/mL (Anexo 1 – Tabela 11 e Figura 3).

Mlobeli; Gutierrez; Maddox (1998), a fim de investigar a fisiologia e a cinética de crescimento de *Bifidobacterium bifidum*, desenvolveram um meio complexo, com variação dos açúcares utilizados como fonte de carbono e com pH controlado, observando que não houve crescimento microbiano em pH 3,5, porém o crescimento foi normal na variação de pH de 4,1 a 6,6.

A capacidade das cepas probióticas para sobreviverem durante a estocagem de produtos derivados do leite foi avaliada por Takahashi et al. (2004), pela viabilidade em leite desnatado acidificado ajustado a valores de pH típicos de leites fermentados (pH 3,8-4,36) e em temperaturas de refrigeração, sendo verificada a sobrevivência das cepas das espécies de *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve* e *B. adolescentis* em leite fermentado (pH 4,6) por duas semanas. Somente uma cepa de *B. longum* exibiu elevada razão de sobrevivência. Tal estudo demonstrou que *B. animalis* subsp. *lactis* possui elevada habilidade para sobreviver em leite acidificado.

Entre as bifidobactérias de origem humana, *B. breve* apresenta sobrevivência ao pH ácido ligeiramente superior às cepas das espécies *B. adolescentis*, *B. longum* biotipo *infantis* e *B. bifidum*. A alta habilidade para sobreviver em condições ácidas e de estresse oxidativo das cepas das espécies *B. animalis* explica seu uso predominante em produtos probióticos fermentados (GUEIMONDE et al., 2004).

#### 4.6.2 Exposição ao oxigênio

Os três isolados de bifidobactérias apresentaram crescimento ao serem expostos ao oxigênio, demonstrando serem aerotolerantes. I6 e I17 apresentaram redução de  $2,8 \times 10^{10}$  UFC/mL (anaerobiose/72 horas) para  $1,3 \times 10^9$  UFC/mL e  $9,3 \times 10^8$  UFC/mL (aerobiose/4 dias, seguido de anaerobiose/72 horas), respectivamente, enquanto que I20 apresentou redução de  $9,3 \times 10^9$  UFC/mL para  $4,3 \times 10^8$  UFC/mL (Anexo 1 – Tabela 12 e Gráfico 2).

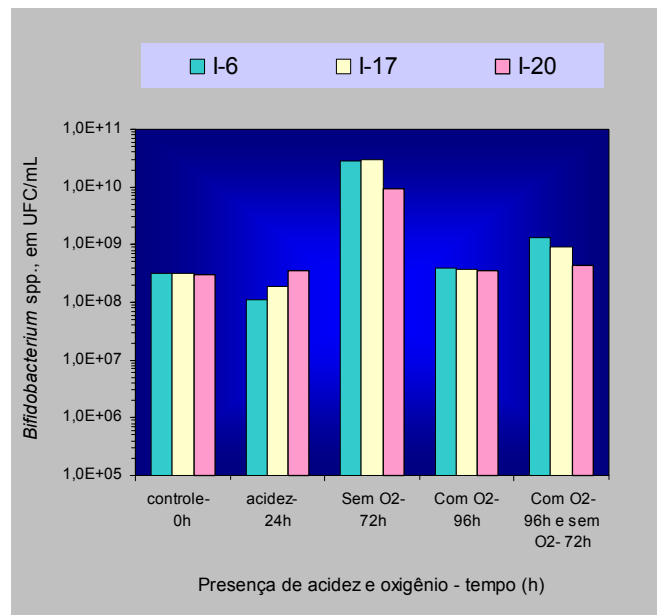
Shimamura et al. (1992), mostraram que *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* e *B. adolescentis* são hábeis para consumir oxigênio pela presença nestas cepas das enzimas NADH oxidase, NADH peroxidase e a baixa atividade de superoxidase dismutase, as quais minimizam a toxicidade dos compostos ativados pelo oxigênio. Esta habilidade está ligada a um deslocamento no metabolismo dos carboidratos destes micro-organismos em resposta ao oxigênio (CONDON, 1987, citado por GONZÁLEZ et al., 2004).

Em seu estudo, Talwalkar; Kailasapathy (2003), encontraram uma mudança na resposta metabólica de quatro espécies de *Bifidobacterium* spp. (*B. infantis*, *B. lactis*, *B. pseudolongum* e *B. longum*.) em diferentes meios com oxigênio, assim como a razão lactato:acetato das bactérias bífidas decresceu com o aumento da porcentagem de oxigênio. O decréscimo na produção de lactato não confere com os resultados encontrados por González et al. (2004), porém uma comparação dos dados é difícil porque tanto as cepas das bifidobactérias utilizadas nos estudos, quanto os meios e as condições de aeração foram diferentes. Concluíram que a aerotolerância difere para cada cepa de bifidobactéria, sendo necessário testar a resistência ao oxigênio dos micro-organismos probióticos a serem utilizados.

González et al. (2004) determinaram o efeito do oxigênio no crescimento de *B. infantis* em fermentação aerada e a formação de subprodutos como acetato, lactato e formato. Os resultados indicaram que *B. infantis* é hábil para crescer na presença de até 80% D.O. (oxigênio dissolvido relativo à saturação com ar), mostrando uma alta aerotolerância nas condições usadas no trabalho. A

fermentação foi iniciada sem oxigênio, que foi sendo gradualmente incorporado ao meio, sugerindo que a célula bacteriana necessita de um período de adaptação. O declínio da % D.O. durante a fase exponencial do crescimento confirmou a assimilação de oxigênio pela bactéria. Seus resultados mostraram que concentrações de acetato foram ligeiramente afetadas pelo oxigênio, exceto a 0,1 vvm (volume de ar, por volume de meio líquido por minuto), deste modo, a capacidade metabólica de *B. infantis* parece ser afetada por fluxo de ar maior que 0,06 vvm. Rendimentos de lactato aumentaram significativamente, de 21,1% em condições sem oxigênio para 56,2% na presença de ar. Piruvato formato liase, a enzima envolvida na síntese de formato, foi relatada por Sawers; Bock (1988) ser muito sensível ao oxigênio; em acordo, somente traços de formato foram produzidos na presença de ar. Esta alteração nas proporções dos produtos finais na presença de oxigênio indicam uma mudança no metabolismo dos carboidratos, e seriam benéficas do ponto de vista tecnológico, onde as características organolépticas melhorariam com aumento da proporção de lactato e o desaparecimento do formato.

Shimamura et al. (1992), relataram a NADH oxidase como a enzima mais envolvida no consumo de oxigênio por *B. infantis*, sendo que a atividade da enzima superóxido dismutase desempenha um papel menor na redução de oxigênio por este micro-organismo.



**Figura 3** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17, I-20) na presença de ácido (24h) e em anaerobiose (72h), aerobiose (96h) e aerobiose (96h) seguida de anaerobiose (72h).

#### 4.6.3 Influência de ingredientes e aditivos alimentares

##### 4.6.3.1 Viabilidade de crescimento em leite

As concentrações de células das bifidobactérias isoladas (I6, I17 e I20) se mantiveram estáveis durante a exposição ao leite, não havendo variação de ciclos Log durante o período de incubação (Anexo 1 – Tabela 13 e Figura 4).

Células liofilizadas de *B. infantis* foram reidratadas e adicionadas a um leite comercialmente pasteurizado de baixa gordura refrigerado ( $2,0 \times 10^6$  UFC/mL) por Collins; Hall (1984) para simular um produto similar ao leite acidófilo não fermentado comercialmente disponível. Contagem de placas foram determinadas por 7 dias, e nenhum decréscimo do número de bifidobactérias foi detectado. Uma amostra com leite em pó desnatado a 10% foi refrigerada por 15 semanas, e a contagem de placas após esse período constatou 50% da contagem inicial. A estabilidade de *B. infantis* durante o processo de liofilização e estocagem do leite desnatado

pasteurizado refrigerado, possivelmente é devido à baixa atividade metabólica destas bactérias a 20°C ou abaixo, podendo ser *B. infantis* um excelente candidato para adjunto da dieta.

Desjardins; Roy; Goulet (1990), avaliaram a atividade fermentadora de oito espécies de bifidobactérias para determinar seu uso potencial em produtos lácteos fermentados. Leite em pó reconstituído com 12% de sólidos foi inoculado com as diferentes espécies e incubado em anaerobiose a 37°C por 8 horas. *Bifidobacterium bifidum* 15696 apresentou maior razão de crescimento específico em relação as demais bifidobactérias, enquanto que *B. adolescentis*, *B. bifidum* 11863 e *B. angulatum* mostraram crescimento fraco. As bifidobactérias que cresceram mais rapidamente no leite eram as originadas de crianças, enquanto que as de crescimento lento eram de indivíduos adultos, sugerindo uma relação entre o meio e condições nutricionais da origem intestinal e sua habilidade de crescimento no leite.

A adição do concentrado celular de *B. longum* resultou num produto com uma concentração celular de  $10^9$  UFC/mL. Durante o período avaliado, entre 28 e 30 dias de armazenamento, a contagem de *B. longum* alcançou a  $10^7$  UFC/mL. Esta concentração do micro-organismo esta dentro da faixa preconizada para o alimento manter sua funcionalidade, pois um produto para ser usado como adjunto dietético deve conter pelo menos  $10^6$  UFC/mL na hora do consumo (RAMOS et al., 2003) .

Cunha et al. (2008), avaliaram a composição físico-química, a contagem de células viáveis de bactérias probióticas e as medidas reológicas de bebida láctea fermentada elaborada com 70% de leite e 30% de soro de queijo (amostra 1) e leite fermentado elaborado com 100% de leite (amostra 2), armazenadas a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  e observaram que a contagem de células viáveis probióticas não apresentaram diferenças antes e após o período de fermentação das amostras 1 e 2.

Segundo Martín-Diana et al. (2003) é recomendado que a quantidade de micro-organismos inoculados seja no mínimo, a mesma desejada no produto final, devido ao baixo desenvolvimento das bifidobactérias no leite.

#### 4.6.3.2 Viabilidade de crescimento em extrato de soja

As bifidobactérias isoladas (I6, I17 e I20) apresentaram boas taxas de crescimento no meio com extrato de soja. Partindo-se das contagens iniciais de  $2,5 \times 10^8$  UFC/mL,  $2,3 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,3 \times 10^8$  UFC/mL, obteve-se as seguintes contagens finais  $3,3 \times 10^{10}$  UFC/mL,  $2,9 \times 10^{10}$  UFC/mL e  $4,4 \times 10^9$  UFC/mL para I6, I17 e I20, respectivamente (Anexo 1 – Tabela 14 e Figura 4).

Shimakawa et al. (2003), adicionaram ao extrato de soja, cepa de *Bifidobacterium breve* Yakult, a fim de produzir uma bebida fermentada, a qual apresentava pH menor que 4,8 e contagem de células viáveis de  $4,0 \times 10^9$  UFC/mL até a fase estacionária. Foi verificado que *B. breve* se manteve estável durante o período de estocagem (2 semanas), bem como após sua administração, houve recuperação nas fezes em concentração maior que  $10^9$  UFC/mL. A boa recuperação nas fezes indicou que as bactérias sobreviveram ao ácido e à bile presentes no trato gastrointestinal. Foi observado que a proteína da soja minimizou a inibição do crescimento da cepa *B. breve* Yakult no meio contendo bile. As proteínas da soja tem o potencial de vincular ácidos biliares e agregá-los firmemente (SUGANO et al., 1990), e podem proteger as bactérias vivas destes ácidos. Para exercer o máximo efeito probiótico das bifidobactérias, é importante que o número de bactérias vivas no alimento e nas fezes após a ingestão do mesmo seja elevado. Preenchendo ambas as condições, há indicações que o extrato de soja fermentado com *B. breve* Yakult pode ser um excelente veículo para bifidobactérias viáveis.

O comportamento de *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, isolados ou em combinação, foram estudados por Wang; Yu; Chou (2002), durante a fermentação e estocagem do extrato de soja. Tal bebida permitiu o crescimento simultâneo de bifidobactéria e *L. acidophilus* ou *S. thermophilus*, mas tanto *B. infantis* quanto *B. longum*, apresentaram efeito deletério no crescimento de *L. bulgaricus*. O extrato de soja fermentado apresentou decréscimo no pH de 6,13 a 4,19 e aumento da acidez de 0,09% para 0,25%, após 48 horas de fermentação com

várias combinações de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas, bem como decréscimo no número de células viáveis de bifidobactérias durante estocagem a 25°C.

Wang; Yu; Chou (2002), verificaram que *B. infantis* e *B. longum* apresentaram bom crescimento quando ambos foram inoculados simultaneamente com bactérias ácido lácticas (BAL) no extrato de soja. O número final de bifidobactérias varia com as diferentes cepas de *Bifidobacterium* e bactérias ácido lácticas usadas como cultura iniciadora. Contudo, *B. infantis* em cultura pura não mostrou nenhum crescimento significativo durante as primeiras 8 horas de cultivo; quando BAL foram incluídas na cultura *starter* a população aumentou aproximadamente 1 log UFC mL<sup>-1</sup> durante as primeiras 8 horas. O número final de *B. infantis* na cultura mista com *L. bulgaricus* foi significativamente maior, entretanto em cultura mista com outra BAL, os números foram significativamente menores que os números em cultura pura após a incubação a 48 horas. O crescimento de *B. longum* na cultura mista com BAL foi similar ao crescimento de *B. infantis*.

#### **4.6.3.3 Viabilidade de crescimento em soro de queijo**

As isoladas I6, I17 e I20 mantiveram seu crescimento estável na presença de soro de queijo, apresentando contagens de células viáveis após 24 horas, para I6 de  $8,9 \times 10^8$  UFC/mL, para I17 de  $7,5 \times 10^8$  UFC/mL e para I20 de  $6,5 \times 10^8$  UFC/mL (Anexo 1 – Tabela 15 e Figura 4).

Madureira et al. (2006), estudaram a viabilidade das cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus brevis* após a incorporação em um queijo processado a partir de soro de leite. Após a inoculação, os queijos experimentais foram incubados a 7°C durante 28 dias. Os resultados mostraram que todas as cepas estudadas foram capazes de manter (ou mesmo aumentar) o número de células viáveis inicial.



As taxas de acidificação de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB), *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr), e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BL), em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (St.) foram estudadas por Almeida; Tamine; Oliveira (2008) em soro de queijo (Minas Frescal). O tempo de fermentação para atingir pH 4,5 foi maior quando a co-cultura St-Lr foi utilizada, enquanto que a fermentação com a St-Lb teve o menor tempo quando comparado com as outras combinações de culturas. Todos os produtos apresentaram evolução da acidez durante o período de armazenamento, onde os valores mais baixos observados foram com o emprego da combinação St-BL.

Almeida; Tamine; Oliveira (2009), procuraram estudar os efeitos das diferentes combinações de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb), *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bl), em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (St) sobre a taxa de desenvolvimento de ácido na mistura de soro e leite, bem como o efeito do nível de sólidos totais das diferentes bases sobre o perfil de acidificação e potencial de promoção da saúde. Todos os produtos tiveram uma pequena produção de ácido, durante o período de armazenamento, e valores menores foram observados quando a co-cultura St-Bl foi empregada. As culturas Lb, Bl e St apresentaram maiores contagens em pH 4,5.

#### **4.6.3.4 Viabilidade de crescimento frente às bactérias do iogurte**

As bifidobactérias isoladas não foram inibidas pela presença das bactérias do iogurte em caldo MRS. As amostras I6, I17 e I20 apresentaram aumento no número de células viáveis após 24 horas de incubação, sendo as respectivas contagens inicial e final, de  $2,5 \times 10^8$  UFC/mL,  $2,3 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL para  $3,3 \times 10^9$  UFC/mL,  $2,9 \times 10^9$  UFC/mL e  $2,7 \times 10^9$  UFC/mL (Anexo 1 – Tabela 16 e Figura 4).

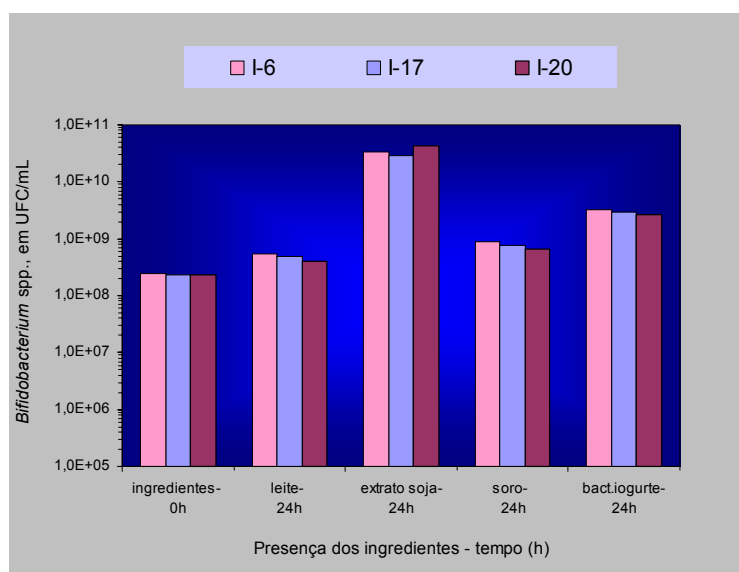
Murti et al. (1993), relataram que a presença de bifidobactérias estimularam o crescimento das bactérias do iogurte durante as 16 horas de fermentação do extrato de soja.

Wang; Yu; Chou (2002), em seu estudo, verificaram que o efeito do crescimento de bifidobactérias na presença das bactérias do iogurte foram espécie-específicos. Uma redução significativa no número de *S. thermophilus* ocorreu no extrato de soja fermentado quando no tempo de fermentação foi estendido de 32 horas para 40 horas. Apesar das culturas puras de *L. bulgaricus* crescerem em extrato de soja, nenhum *L. bulgaricus* foi recuperado após 8h de fermentação do leite de soja originalmente inoculado simultaneamente com ambas *B. longum* e *B. infantis*. Bifidobactérias tem um efeito deletério em *L. bulgaricus* em leite de soja. Pode-se concluir que a fermentação do leite de soja com culturas mistas das bifidobactérias testadas e *L. bulgaricus* não é apropriada.

Além de competir por nutrientes com as bifidobactérias, a morte de *L. bulgaricus* pode ser atribuída também à produção de ácido acético pelas bifidobactérias (SAMONA; ROBINSON; MARAKIS, 1996).

O emprego de *S. thermophilus* segundo Lin et al. (2006) diminuiu o teor de oxigênio no meio, contribuindo para a estabilidade e manutenção das bifidobactérias

Além da quantidade inoculada, a viabilidade de bactérias probióticas em iogurtes pode também ser dependente da cultura utilizada, da interação entre outras espécies presentes, da presença de oxigênio dissolvido e do tipo de matéria prima empregada (MARAGKOUidakis et al., 2006; SHAH, 2000).



**Figura 4** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17, I-20) na presença de leite (24h), extrato de soja (24h), soro de leite (24h) e bactérias do iogurte (24h).

#### 4.6.3.5 Influência dos aditivos

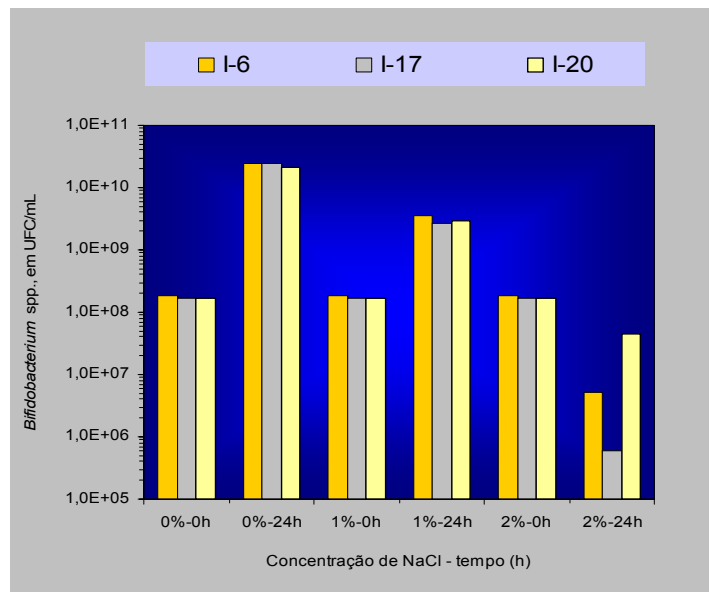
As três cepas isoladas de bifidobactérias (I6, I17 e I20) foram analisadas frente à presença de sal, açúcares, adoçantes, corantes naturais, flavorizantes, polpas, espessantes/estabilizantes e conservantes, observando-se se houve crescimento normal das bifidobactérias isoladas, se a concentração das mesmas se manteve estável ou se houve inibição do crescimento na presença do aditivo.

##### 4.6.3.5.1 Sal

Na presença de 1% e 2% de cloreto de sódio (NaCl) as bifidobactérias isoladas apresentaram redução de crescimento, sendo que I6 reduziu de  $2,3 \times 10^{10}$  UFC/mL (após 24 horas de incubação em meio controle, sem NaCl) para  $3,6 \times 10^9$  UFC/mL (1% NaCl) e  $0,5 \times 10^8$  UFC/mL (2% NaCl); I17 diminuiu de  $2,4 \times 10^{10}$  UFC/mL para  $2,7 \times 10^9$  UFC/mL (1%) e  $0,06 \times 10^8$  UFC/mL (2%) e I20 de  $2,1 \times 10^{10}$  UFC/mL para  $2,9 \times 10^9$  UFC/mL (1%) e  $4,6 \times 10^7$  UFC/mL (2%) (Anexo 1 – Tabela 17 e Figura 5).

NaCl é amplamente usado na indústria com agente conservante, para conferir características sensoriais e para satisfazer as necessidades humanas diárias. Ainda, NaCl é importante para controlar a maturação de queijos (REINHEIMER et al., 1997, citados por VINDEROLA et al., 2002). Porém, o conteúdo de sal dos produtos lácteos fermentados pode comprometer a viabilidade celular das culturas probióticas (GOMES; TEIXEIRA; MALCATA, 1998).

Na pesquisa realizada por Vinderola et al. (2002), as bactérias ácido lácticas foram mais sensíveis ao sal (NaCl), que as bactérias probióticas. Entre as probióticas, as cepas de bifidobactérias foram mais sensíveis ao sal que as cepas de *L. acidophilus*, onde *B. longum* A1 e A7 foram inibidas na presença de 2% de NaCl. Porém, NaCl não afetou o crescimento das demais cepas de *Bifidobacterium* testadas.



**Figura 5** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença de NaCl (0, 1 e 2%), a 24 h.

#### 4.6.3.5.2 Açúcares

As bifidobactérias isoladas I6, I17 e I20 não apresentaram alterações significativas na sua capacidade de crescimento na presença dos açúcares sacarose e lactose (8% e 12%), conforme Tabelas 18 e 19 do Anexo 1 e Figura 6.

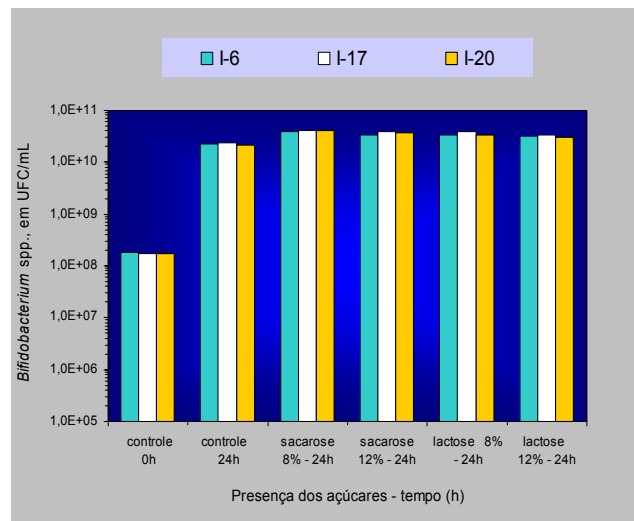
Wang; You; Chou (2002), analisando bebidas fermentadas à base de extrato de soja, verificaram poucas alterações nos valores de pH, com ou sem adição de sacarose, armazenadas a 5°C. Contudo, grandes reduções de valores de pH ocorreram quando as bebidas foram armazenadas a 25°C, com maior redução nas bebidas suplementadas com sacarose. Isto pode ser atribuído à maior atividade metabólica de ambos *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias a 25°C do que a 5°C. A adição de sacarose nas bebidas aumentou a razão de declínio dos números de ambos. As reduções nos números foram maiores para bifidobactérias que para as bactérias ácido lácticas. O número de *B. infantis* e *B. longum* declinou mais rapidamente a 25°C em bebidas suplementadas com sacarose contendo *Streptococcus thermophilus*, do que nas que continham *L. acidophilus*.

*Buttermilk* probiótico com diversas opções de sabores e versão dietética foi desenvolvido por Antunes et al. (2007), onde foram utilizadas as culturas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e uma mistura de linhagens composta por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Constataram que o tipo de agente adoçante (sacarose ou sucralose) não interferiu na viabilidade da *B. animalis*, sendo que as médias das contagens de bifidobactérias para ambos agentes foram muito semelhantes (8,04 e 8,09 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

Vinderola et al. (2002), provaram que as bactérias probióticas são menos sensíveis para a presença de açúcares que as bactérias ácido lácticas iniciadoras. *Bifidobacterium longum* A1 e A7 foram inibidas na presença de 15% e 20% de sacarose, e na concentração de 15% de lactose. *B. bifidum* A1, A7 e BL, assim como *Bifidobacterium* sp. A2 e *B. bifidum* A12 e BBI tiveram seu crescimento inibido na presença de 20% de lactose. *B. bifidum* Bb12 apresentou crescimento normal frente às concentrações de sacarose ou lactose testadas.

Concentrações mínimas de lactose necessárias para o crescimento e metabolismo fermentativo das bifidobactérias *B. lactis* Bb12, *B. longum* Bb46, *B.*

*bifidum* C-1, *B. bifidum* C-2, *B. lactis* C-3 e *B. breve* C-4 foram analisadas em caldo MRS, com lactose como fonte de carbono nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/v) e púrpura de bromocresol como indicador de produção de ácido. Nos meios contendo concentrações iguais ou maiores que 0,5% de lactose, *B. lactis* Bb12 e *B. longum* Bb46 se mostram mais ativas, mudando completamente a cor do meio após 8 horas de incubação. *B. lactis* C-3 necessitou de suprimento igual ou superior a 2% de lactose para produzir efeito similar. *B. bifidum* C-1 não fermentou lactose nas concentrações testadas, indicando baixa atividade da  $\beta$ -galactosidase. Entretanto, *B. bifidum* C-2 fermentou a lactose em concentrações iguais ou maiores que 0,5% após 8 horas de incubação.



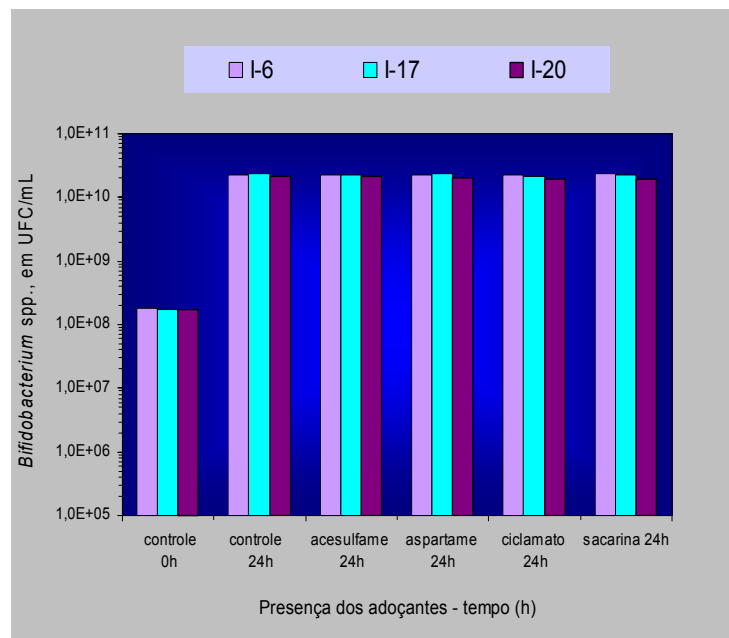
**Figura 6** Resistência das bifidobactérias isoladas I-6, I-17 e I-20 na presença dos açúcares sacarose (8%, 12%) e lactose (8%, 12%) a 24h.

#### 4.6.3.5.3 Adoçantes

Na presença dos adoçantes testados, acesulfame, aspartame, ciclamato e sacarina, as bifidobactérias isoladas I6, I17 e I20 mantiveram suas contagens na presença destes aditivos muito próximas da contagem no meio controle (sem a adição dos adoçantes), como pode ser constatado nas Tabelas 20, 21, 22 e 23 do Anexo 1 e Figura 7, demonstrando que estes não afetam seu crescimento.

Samona; Robinson (1993), trabalhando com aspartame nas concentrações de 0,04 e 0,08% não detectou nenhuma influência durante o crescimento de bifidobactéria no leite.

Vinderola et al. (2002), mostraram que acesulfame e aspartame, nas concentrações normalmente usadas em bebidas lácteas fermentadas (0,03%) não inibiram as culturas lácticas iniciadoras e as bactérias probióticas. Concentração mais elevada de aspartame testada (0,12%) foi inibitória somente para três cepas de bactérias ácido lácticas e uma cepa probiótica.



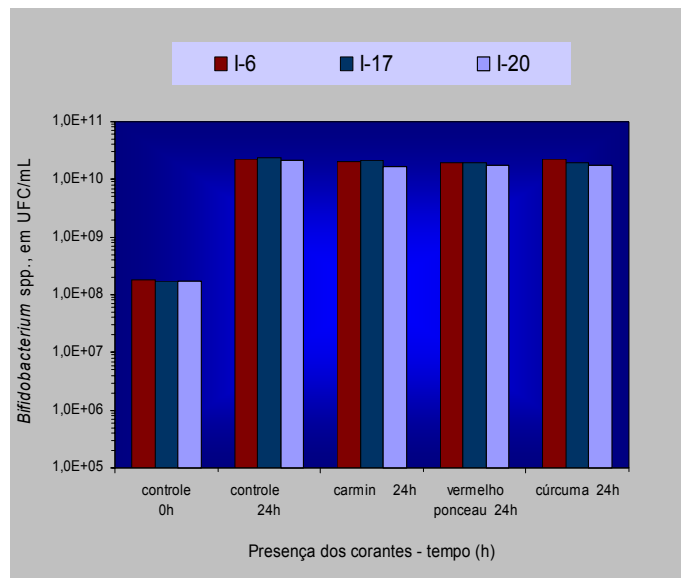
**Figura 7** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos adoçantes acesulfame, aspartame, ciclamato e sacarina a 24h.

#### 4.6.3.5.4 Corantes naturais

Os corantes (carmin, vermelho ponceau, cúrcuma) acrescentados nos meios com as bifidobactérias isoladas I6, I17 e I20 não afetaram o seu crescimento, cujas constagens inicial e final, foram próximas tanto para o meio controle (sem a adição do corante), quanto para os testes (Anexo 1 - Tabelas 24, 25 e 26 e Figura 8).

Os corantes naturais para leites fermentados (carmin, cúrcuma/bixina e bixina) não afetaram o crescimento das bactérias probióticas avaliadas por Vinderola et al. (2002), entre elas, espécies de *Bifidobacterium*.

Antunes et al. (2007) observaram que a adição de aromas e corantes ao *buttermilk* podem interferir nas populações das culturas durante o armazenamento do produto, apesar que o número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis*, utilizado na elaboração do produto, atendeu a legislação em todas as amostras. No início do armazenamento, a adição de edulcorante, corantes e aromatizantes não influenciou na população microbiana obtida. Ao término da estocagem, as amostras de todos os sabores adicionadas de sacarose, quando comparadas ao sabor natural, tenderam a apresentar populações de bifidobactérias estatisticamente mais baixas. Por outro lado, os sabores abacaxi com menta, graviola e cupuaçu dietéticos (com sucralose) apresentaram populações maiores que as amostras dos mesmos sabores adicionadas de sacarose.



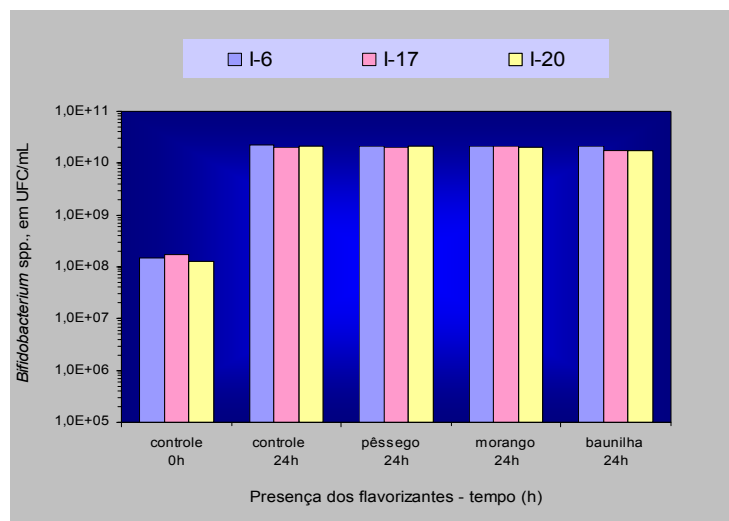
**Figura 8** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos corantes carmin, vermelho ponceau e cúrcuma a 24h.



#### 4.6.3.5.5 Flavorizantes

Os flavorizantes de pêssego, morango e baunilha não influenciaram o crescimento das três bifidobactérias isoladas (I6, I17 e I20), as quais obtiveram a mesma proporção de aumento do número de células viáveis no meio controle (sem os flavorizantes) e nos meios testes (Anexo 1 – Tabelas 27, 28 e 29 e Figura 9).

Vinderola et al. (2002), verificaram que uma mistura comercial de flavorizante e corante de morango na concentração de 0,8% impediu o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 35914 e retardou o crescimento de *B. bifidum* Bb12 e das cepas de *B. longum* A1, A7 e BL. A presença de adoçantes e aromatizantes, adicionados nas concentrações empregadas industrialmente, não influenciaram no desenvolvimento das culturas.

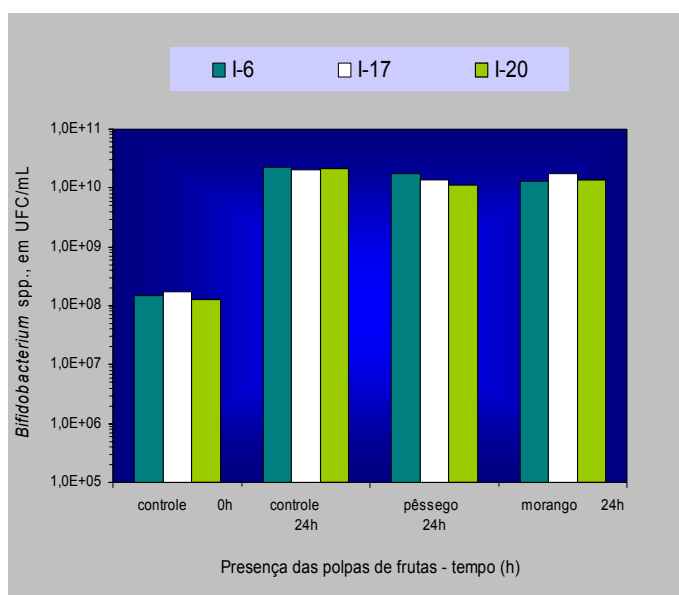


**Figura 9** Resistência das bifidobactérias isoladas na presença dos flavorizantes de pêssego, morango e baunilha a 24h.

#### 4.6.3.5.6 Polpas

A adição das polpas das frutas pêssego e morango não influenciaram o crescimento das bifidobactérias testadas I6, I17 e I20, de acordo com as Tabelas 30 e 31 do Anexo 1 e Figura 10.

Considerando que os produtos lácteos fermentados têm uma elevada qualidade nutricional, a indústria láctea está continuamente experimentando com a produção de diferentes tipos de iogurtes, incluindo iogurtes adicionados de frutas (CON et al., 1996). Contudo, os dados que existem são insuficientes em relação ao efeito que as frutas podem ter na sobrevivência da microbiota destes produtos (VENIZELOU et al., 2000, citados por VINDEROLA et al., 2002).



**Figura 10** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença das polpas de morango e pêsego a 24h.

#### 4.6.3.5.7 Espessantes/Estabilizantes

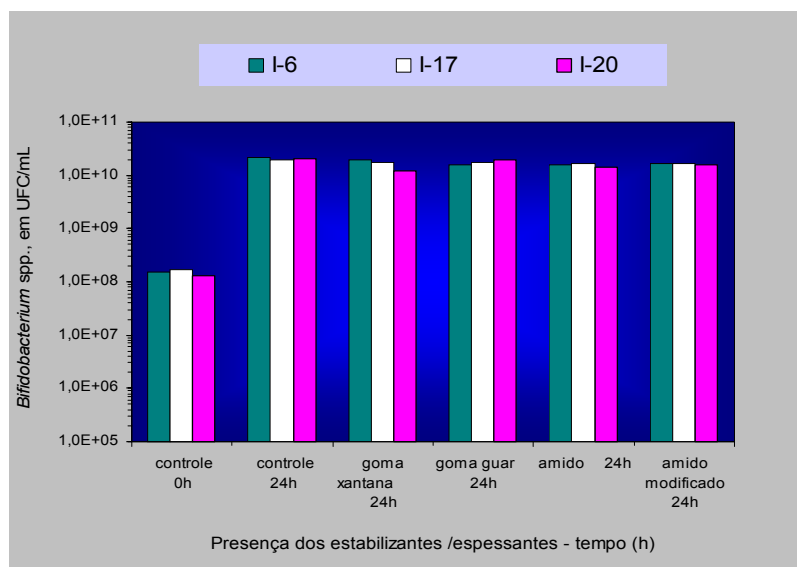
O crescimento das bifidobactérias isoladas foi analisado na presença de goma xantana, goma guar, amido e amido modificado, e não foram observados decréscimos significativos nas contagens das cepas I6, I17 e I20 após a exposição a estes espessantes/estabilizantes, como apresentado pelas Tabelas 32, 33, 34 e 35 do Anexo 1 e Figura 11.

Os hidrocolóides neutros tais como o amido, a goma guar, a goma xantana e a pectina, são agentes estabilizantes, cuja função principal é proporcionar uma maior

retenção de água no sistema, aumentando a viscosidade e melhorando o corpo e a textura, uma vez que atuam também como espessantes.

Vinte e nove espécies de bifidobactérias de origem humana e animal foram testadas por Crociani et al. (1996) quanto a sua habilidade para fermentar carboidratos complexos, visto que a maioria destes compostos não são degradados ou absorvidos pelo estômago ou intestino delgado, chegando ao cólon intactos, onde podem ser usados como fonte de carbono e energia para as bactérias ali residentes. Entre as oito espécies isoladas de fezes de crianças, verificaram que amilose e amilopectina (componentes do amido) foram degradadas por cepas de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. globosum* e *B. pseudocatenulatum*; enquanto que goma guar foi degradada somente por cepas de *B. dentium*, mostrando que a capacidade para degradar os carboidratos é cepa-específica.

Degnan; Macfarlane (1994), verificaram que *Bifidobacterium pseudolongum* NCFB degrada amido, porém não foi detectada atividade da enzima amilase, sugerindo que adotou uma estratégia para utilizar os produtos gerados na quebra do amido por outras bactérias e pela amilase pancreática residual no cólon, bem como sua habilidade para utilizar o amido depende da sua capacidade para produzir uma ou duas  $\alpha$ -glicosidases.



**Figura 11** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos estabilizantes/espessantes goma xantana, goma guar, amido e amido modificado a 24h.

#### 4.6.3.5.8 Conservantes

Na presença dos três conservantes testados (nisina, lisozima e sorbato de potássio) houve redução da viabilidade celular das três cepas isoladas de bifidobactérias (Anexo 1 – Tabelas 36, 37 e 38 e Figura 12).

Partindo-se de uma contagem de células viáveis da bifidobactéria isolada I6 de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, após 24 horas de exposição aos conservantes, obteve-se redução do número de células na presença de nisina para  $2,7 \times 10^6$  UFC/mL, na presença de lisozima para  $2,3 \times 10^7$  UFC/mL e na presença de sorbato de potássio para  $2,9 \times 10^7$  UFC/mL.

I17 ao ser testada em meio contendo nisina, lisozima e sorbato de potássio, após 24 horas de incubação, apresentou redução no crescimento de  $1,7 \times 10^8$  UFC/mL para  $2,9 \times 10^6$  UFC/mL,  $2,4 \times 10^7$  UFC/mL e  $2,9 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente.

A bifidobactéria isolada I20 também manifestou diminuição do crescimento na presença de nisina, lisozima e sorbato de potássio. Tendo como contagem inicial  $1,3 \times 10^8$  UFC/mL, após as 24 horas de exposição aos aditivos, as contagens finais foram  $2,8 \times 10^6$  UFC/mL,  $2,4 \times 10^7$  UFC/mL e  $2,7 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente.

A nisina é uma bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que apresenta uma atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias Gram positivas, incluindo as esporogênicas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (MORENO; VIALTA; LERAYER, 2008). É permitida em muitos países para a conservação de queijos processados e outros produtos lácteos (RUSSEL; HUGO; AYLIFFE, 1991, citados por VINDEROLA et al., 2002). No Brasil, foi aprovada para ser utilizada em todos os tipos de queijos, inclusive os processados, numa dose máxima de 12,5 mg/kg de produto.

Vinderola et al. (2002), em seu estudo, verificaram que todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* foram resistentes à nisina (2 ppm); enquanto que das espécies de bifidobactérias, somente *B. longum* B7 e *B. bifidum* A12 conseguiram crescer em meio que teve nisina adicionada.

Rada; Dlabal (1998), analisaram a suscetibilidade de cepas de bifidobactérias para o conservante nisina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) utilizando o método de difusão em orifícios (*well diffusion*). Constataram que a sensibilidade das bifidobactérias foi variável, mas cepas resistentes puderam ser selecionadas. Todas as cepas de bifidobactérias analisadas foram sensíveis à presença de nisina com zonas de inibição de 3 a 18 mm. *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 foi a cepa mais suscetível (zona de inibição de 18 mm), enquanto que cepas de *B. longum* isoladas de fezes de crianças apresentaram a menor zona de clareamento (3 mm), demonstrando que, em geral, as cepas isoladas das amostras fecais foram mais resistentes que as cepas de coleções de culturas.

Lisozima é uma enzima extraída da clara de ovo, cuja atividade catalítica está relacionada à hidrólise da ligação glicosídica  $\beta$  presentes no principal constituinte da

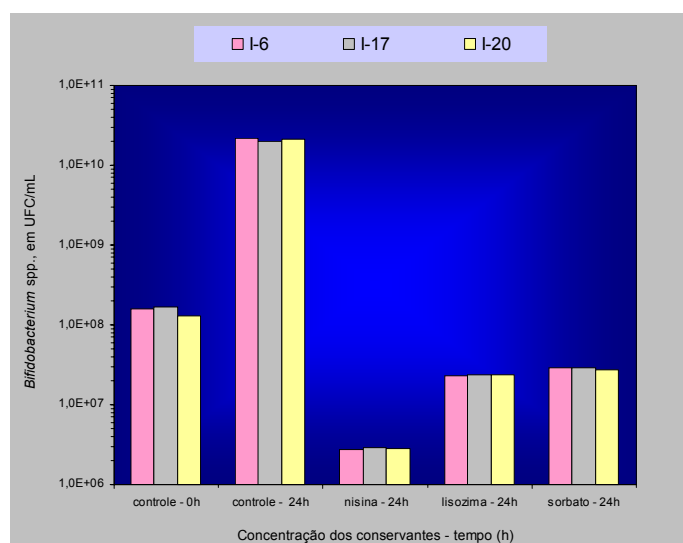
parede celular de bactérias, atuando diretamente em bactérias Gram positivas (DUARTE et al., 2002). É um conservante atrativo porque inibe a deterioração de alimentos e bactérias as quais são nocivas para a saúde humana (SPAHR; URL, 1994, citados por VINDEROLA et al., 2002), mas não afetam significativamente o crescimento de lactobacilos e estreptococos termofílicos, em níveis de até 25 ppm (LODI et al., 1983, citados por VINDEROLA et al., 2002). Lisozima pode ser usada em queijos probióticos duros e semiduros, mas para isso, é importante conhecer a resistência das culturas probióticas. Vinderola et al. (2002) não observaram nenhum efeito da lisozima sobre as bactérias probióticas e bactérias ácido lácticas iniciadoras, contudo a seleção da cepa a ser usada é obrigatória se níveis iguais ou superiores a 50 ppm de lisozima forem utilizados.

Gagnon et al. (2004) isolaram bifidobactérias de recém nascidos de uma semana e testaram sua resistência na presença de lisozima. Todos os isolados toleraram a concentração de 300 µg/mL de lisozima, mas somente duas cepas padrões *B. breve* ATCC 15700 e *B. infantis* ATCC 15697 conseguiram sobreviver. Verificaram que o gênero *Bifidobacterium* parece ser mais resistente à lisozima que outras bactérias Gram positivas.

Muitos produtos alimentícios apresentam sorbato de potássio como conservante. Este tem como função inibir o crescimento de diversos microorganismos, entre os quais, leveduras, mofo e bactérias. No entanto, não desempenham efeitos sobre os micro-organismos responsáveis pela produção do ácido láctico, sendo então antimicrobianos ideais na produção de leites fermentados em geral. Leites fermentados com agregado de polpa de frutas, estão mais suscetíveis à deterioração quando comparados aos leites fermentados exclusivamente lácteos e isso justificaria o uso do sorbato de potássio em sua formulação (LABCONSS, 2008).

Nos Estados Unidos os leites fermentados com polpa de frutas não apresentam na sua formulação quaisquer substâncias antimicrobianas. Porém, o não uso de um conservante em um leite fermentado com agregado de polpa de

fruta, promoveria uma deterioração mais rápida. Sabe-se que há especulações e projetos em andamento sobre o emprego destes antimicrobianos nestes produtos. Atualmente, a legislação brasileira permite o uso destas substâncias nos leites fermentados com agregados de polpas de frutas, entretanto na literatura não se encontram respostas no que diz respeito sobre a real necessidade do emprego de conservantes nestes produtos e se os mesmos não afetariam a quantidade de bactérias necessárias para realização do efeito probiótico (LABCONSS, 2008).



**Figura 12** Resistência das bifidobactérias isoladas (I-6, I-17 e I-20) na presença dos conservantes nisina, lisozima e sorbato de potássio.

A tolerância de bactérias iniciadoras e probióticas aos aditivos lácteos deve ser um critério de seleção a fim de alcançar a melhor combinação de cepas para otimizar seu crescimento e viabilidade celular durante o processo industrial e a estocagem do produto (VINDEROLA et al., 2002).

## 5 CONCLUSÃO

Foram isoladas de fezes de recém nascidos culturas bacterianas, das quais três (I6, I17 e I20) identificou-se por meio de PCR e ARDRA como sendo do gênero *Bifidobacterium*. As três novas bifidobactérias resistiram à presença do suco gástrico e bile, demonstrando possuir atividade probiótica.

Pelo perfil de fermentação dos carboidratos, as três cepas isoladas apresentaram-se muito semelhantes, sendo que todas fermentaram ribose, galactose, glicose, frutose, manose, manitol, sorbitol, esculina, salicina, maltose, lactose, melibiose, sacarose, rafinose e turanose, sugerindo pela identificação fenotípica, pertencerem à espécie *Bifidobacterium breve*.

As bifidobactérias isoladas I6 e I17 apresentaram resistência a valores baixos de pH, mantendo-se viáveis e dentro dos padrões aceitáveis ( $10^6$  UFC/mL). As três bifidobactérias isoladas apresentaram crescimento ao serem expostas ao oxigênio, indicando ser aerotolerantes.

As concentrações de células das bifidobactérias isoladas se mantiveram estáveis tendo como meios base leite e soro de queijo, e apresentaram bom crescimento na presença do extrato de soja. As bifidobactérias isoladas não foram inibidas pela presença das bactérias do iogurte.

Entre os aditivos pesquisados, foram observadas atividade inibitória do crescimento somente quando avaliadas na presença de NaCl e dos conservantes, com diminuição da viabilidade das cepas isoladas, porém, estatisticamente, não houve diferença significativa entre os meios controles e os meios testes com aditivos.

Estudos adicionais para a identificação precisa e determinação das características toxicológicas são necessários para o uso das cepas de bifidobactérias isoladas na produção de alimentos funcionais probióticos.



## 6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctea. **Indústria de Laticínio**, v.32, p.50-54, 2001.
- ALMEIDA, K.E.; TAMINE, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas Frescal Cheese Whey. **LWT**, v.41, p.311-316, 2008.
- ALMEIDA, K.E.; TAMINE, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p.672-678, 2009.
- ANTUNES, A.E.C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.27, p.83-90, 2007.
- BALLABRIGA, A. **Probióticos em Neonatología**. Disponível em: <<http://www.se-neonatal.es/se-neonatal/Oviedo2001/probióticos.pdf>>. Acessado em: 08/10/2002.
- BARBOSA, F.H.F.; SILVA, A.M.; MARTINS, F.S.; NICOLI, J.R.. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, p.1-11, 2005.
- BEERENS, H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.155-157, 1990.
- BEERENS, H.; GAVINI, F.; NEUT, C. Effect to exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. **Anaerobe**, v.6, p.65-67, 2000.
- BERRADA, N.; LEMELAND, J.F.; LAROCHE, G.; THOUVENOT, P.; PAIA, M.. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.409-413, 1991.
- BERTHIER, F.; EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. **FEMS Microbiology Letters**, v.161, p.97-106, 1998.
- BEZIRTZOGLOU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v.3, p.173-177, 1997.
- BLANCHETTE, L.; ROY, D. Production of cultured Cottage cheese dressing by Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1421-1429, 1995.
- BOURGET, N.; SIMONET, J.M.; DECARIS, B. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p.11-20, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Portaria N° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de março de 1996, seção 1, p. 3977. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 22/11/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS N° 540, de 27 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 de outubro de 1997. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acessado em: 13/04/2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Portaria N° 369, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997, seção 1, p. 19699. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: 22/11/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 91, de 18 de outubro de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos com Soja. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de outubro de 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acessado em: 20/04/2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 02, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acessado em: 20/04/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002, seção 1, p. 13. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 22/11/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de outubro de 2007, seção 1, p.5. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 22/11/2008.

BRIGIDI, P.; SWENNEN, E.; VITALI, B.; ROSSI, M.; MATTEUZI, D.. PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy an yogurt consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.203-209, 2003.

BUONO, M.A.; SETSER, C.; ERICKSON, L.E.; FUNG, D.Y.C. Soymilk yogurt: sensory evaluation and chemical measurement. **Journal of Food Science**, v.55, p.528-531, 1990.

CASTRO, F.P. **Influência de diferentes proporções de soro de queijo e oligofrutose sobre as propriedades de bebidas lácteas fermentadas probióticas**. 2007. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K.. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.1-27, 1997.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Letters Applied in Microbiology**, v.26, p.333-337, 1998.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K.. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.759-768, 1998a.
- CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, P.. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**. V.16, p.1229-1240, 2006.
- CHENG, Y.J.; THOMPSON, L.D.; BRITTIN, H.C. Sogurt, a yogurt-like soybean product: development and properties. **Journal of Food Science**, v.55, p.1178-1179, 1990.
- CLARK, P.A.; COTTON, L.N.; MARTIN, J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II- tolerance to simulated pH of human stomachs. **Cultured Dairy Products Journal**, v.28, p.11-14, 1993.
- 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. **Cultured Dairy Products Journal**, v.29, p.18-21, 1994.
- COLLADO, M.C.; MORENO, Y.; COBO, J.M.; MATEOS, J.A.; HERNÁNDEZ, M. Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human faeces during fermented milk administration. **Food Research International**, v.39, p.530-535, 2006.
- COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human faeces based on their acid-adaptation ability. **Journal of Microbiology Methods**, v.66, p.560-563, 2006.
- COLLINS, E.B.; HALL, B.J. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1376-1380, 1984.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.
- CON, A.H.; CAKMAKCI, S.; CAGLAR, A.; GÖKALP, H.Y.. Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in Turkey. **Journal of Food Protection**, v.59, p.402-406, 1996.
- COPPA, G.V. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. **Pediatrics**, v.91, p.637-641, 1993.
- CROCIANI, F.; BIAVATI, B.; ALESSANDRINI, A.; CHIARINI, C.; SCARDOVI, V.. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.46, p.564-571, 1996.

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

CUNHA, T.M.; CASTRO, F.P.; BARRETO, P.L.M.; BENEDET, H.D.; PRUDÊNCIO, E.S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p.103-116, 2008.

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

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2804-2816, 1998.

DEGNAN, B.A.; MACFARLANE, G.T. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.84, p.151-156, 1991.

DEGNAN, B.A.; MACFARLANE, G.T. Synthesis and activity of  $\alpha$ -glucosidase produced by *Bifidobacterium pseudolongum*. **Current Microbiology**, v.29, p.43-47, 1994.

DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.

DELCENSERIE, V.; BECHOUX, N.; CHINA, B.; DAUBE, G.; GAVINI, F.. A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.61, p.55-67, 2005.

DE VRIES, W.; STOUTHAMER, A.H. Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. **Archives Mikrobiology**, v.65, p.275-287, 1969.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. **Journal Dairy Science**, v.77, p.2854-2864, 1994.

DONG, X.; CHENG, G.; JIAN, W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.386-390, 2000.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E.M.M.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antoine van Leewenhoek**, v.76, p.279-292, 1999.

FASOLI, S.; MARZOTTO, M.; RIZZOTTI, L.; ROSSI, F.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.59-70, 2003.

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

FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 206p, 2003.

FUCHS, R.H.B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.175-181, 2005.

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

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994, p.76-77.

GAGNON, M.; KHEADR, E.E.; LE BLAY, G.; FLISS, I.. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.69-78, 2004.

GALLAHER, D.D.; STALLINGS, W.H.; BLESSING, L.L.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J.. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **Journal of Nutrition**, v.126, p.1362-1371, 1996.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

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

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

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. **Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas**. Disponível em: <[http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pd/agentes\\_probioticos\\_em\\_alimentos.pdf](http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pd/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf)>. Acesso em: 08/10/2002.

GOMES, A.M.P.; TEIXEIRA, M.G.M.; MALCATA, 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, 1998.

GONZÁLEZ, R., BLANCAS, A.; SANTILLANA, R.; AZAOLA, A.; WACHER, C.. Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.606-610, 2004.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES A.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37, p.839-850, 2004.

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

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.3745-3795, 2001.

HOLT, J.G. **Berge's Manual of Determinative Bacteriology**. Ninth edition. Baltimore: William e Wilkins, 1994.

HOPKINS, M.J.; CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbon sources. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.381-386, 1998.

IBRAHIM, S.A.; BEZKOROVAINY, A. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salts. **Journal Science and Food Agriculture**, v.62, p.351-354, 1993.

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

IWATA, M.; MORISHITA, T. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. **Letters in Applied Microbiology**, v.9, p.165-168, 1989.

JIAN, W.; ZHU, L; DONG, X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, v.51, p.1633-1638, 2001.

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

KIM, M.; SHIN, H.K. The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentration and fecal lipid excretion in rats. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1731-1736, 1998.

KLIJN, A.; MERCENIER, A.; ARIGONI, F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.491-509, 2005.

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

KOLETZKO, B.; AGGETT, P.J.; BINDELS, J.G.; BUNG, P.; FERRÉ, P.; GIL, A.; LENTZE, M.J.; ROBERFROID, M.; STROBEL, S., Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **British Journal Nutrition**, v.80(Suppl.1), p.S5-S45, 1998.

KOO, M.; RAO, V. Long-term effect of Bifidobacteria and neosugar on precursor lesionsof colonic cancer in CF<sub>1</sub> mice. **Nutrition and Cancer**, v.16, p.249-257, 1991.

- KRIZOVÁ, J.; SPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.36-44, 2006.
- KULLEN, M.J.; AMANN, M.M.; O'SHAUGHNESSY, M.J.; O'SULLIVAN, D.J.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprint demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. **Journal of Nutrition**, v.127, p.89-94, 1997.
- KULLEN, M.J.; BRADY, L.J.; O'SULLIVAN, D.J. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p.377-383, 1997.
- LABCONSS. Laboratório de Vida Urbana, Consumo & Saúde - FF/UFRJ. **Leites fermentados: identidade, qualidade e rotulagem sob o olhar da saúde pública**. Disponível em: <<http://leitinhosfermentados-ufrrj.blogspot.com>>. Acessado em 12/12/2008.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3069-3075, 1995.
- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, v.30, p.2-7, 1995.
- LAPIERRE, L., UNDERLAND, P., COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.1192-1196, 1992.
- LAROIA, S.; MARTIN, J.H. Methods for enumeration and propagating bifidobacteria. **Cultured Dairy Products Journal**, v.26, p.32-33, 1991.
- LEVRAT, M.A.; FAVIER, M-L.; MOUNDRAS, C.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C.; MORAND, C. Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. **Journal of Nutrition**, v.124, p.531-538, 1994.
- LIM, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2168-2174, 1993.
- LIM, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2108-2112, 1995.
- LIN, M.Y., SAVAIANO, D.; HARLANDER, S. Influence of non fermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.87-95, 1991.
- LIN, W.H.; HWANG, C-F.; CHEN, L-W.; TSEN, H-Y. Viable counts, characteristics evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, p.74-81, 2006.

- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69(Suppl), p.1035S-1045S, 1999.
- MADUREIRA, A.R.; GIÃO, M.S.; PINTADO, M.E.; GOMES, A.M.P.; FREITAS, A.C.; MALCATA, F.X. Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. **Journal of Food Science**, v.70, p.160-165, 2006.
- MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v.99, p.287-296, 2005.
- MAKRAS, L.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v.16, p.1049-1057, 2006.
- MANGIN, I.; BOURGET, N.; BOUHNİK, Y.; BISETTI, N.; SIMONET, J.M.; DECARIS, B. Identification of *Bifidobacterium* strains by rRNA gene restriction patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1451-1458, 1994.
- MANGIN, I.; SUAU, A.; MAGNE, F.; GARRIDO, D.; GOTTELAND, M.; NEUT, C.; POCHART, P. Characterization of human intestinal bifidobacteria using competitive PCR and PCR-TTGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v.55, p.28-37, 2006.
- MARAGKOUidakis, P.A.; MIARIS, C.; ROJEZ, P.; MANALIS, N.; MAGKANARI, F.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. **International Dairy Journal**, v.16, p.52-60, 2006.
- 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. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1031-1037, 1997.
- MARTÍN-DIANA, A.B.; JANER, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.13, p.827-833, 2003.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; GÓMEZ, R. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented Milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. **International Dairy Journal**, v.17, p.116-122, 2007.
- MATObA, T.; HIDAka, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipoxigenase-2-isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.33, p.856-860, 1985.
- MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R.; OYAIZU, H.. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v.167, p.113-121, 1998.
- MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R.; FUKUDA, M., OYAIZU, H.. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16s r RNA-gene-targeted species-specific primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4506-4512, 1999.



MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R. Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v.4, p.61-69, 2003.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H<sup>+</sup>-APTase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.109-113, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MATTÖ, J.; ALAKOMI, A-L.; VAARI, A.; VIRKAJÄRVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v.16, p.1029-1037, 2006.

MAUS, J.E.; INGHAM, S.C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold-and acid-tolerance of bifidobacteria. **Journal of Applied and Microbiology**, v.95, p.146-154, 2003.

McCARTNEY, A.L.; TANNOCK, G.W. Ribotyping of *Bifidobacterium* strains using cells embedded in agarose plugs and a 16S rDNA probe. **Microbiology Ecology Health Diseases**, v.8, p.79-84, 1995.

McDONOUGH, F.E., HITCHINS, A.D., WONG, N.P. Effects of yogurt and freeze-dried yogurt on growth stimulation of rats. **Journal of Food Science**, v.47, p.1463-1465, 1982.

MEDINA, L.M. and JORDANO, R. Survival of constitutive microbiota in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **Journal Food Protection**, v.56, p.731-733, 1994.

MEDRANO, A.; HERNANDEZ, A.; PRODANOV, M.; VIDAL-VALVERDE, C. Riboflavin, alfa-tocoferol and retinol retention in milk after microwave heating. **Lait**, v.74, p.153-159, 1994.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMAN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk system. **Systematic and Applied Microbiology**, v.20, p.57-64, 1997.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v.6, p.263-268, 1990.

MITSUOKA, T.; KANEUCHI, C. Ecology of the bifidobacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.30, p.1799-1810, 1977.

MIYAKE, T.; WATANABE, K.; WATANABE, T.; OYAIZU, H. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on the 16S rDNA sequences. **Microbiology and Immunology**, v.42, p.661-667, 1998.

MLOBELI, N.T.; GUTIERREZ, N.A.; MADDIX, I.S. Physiology and kinetics of *Bifidobacterium bifidum* during growth on different sugars. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.125-128, 1998.

MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, v.23, p.29041, 1990.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S. **Ação da nisina sobre bactérias esporogênicas do gênero Bacillus**. Disponível em: [http://www.milknet.com.br/pg=artigo\\_tecnico](http://www.milknet.com.br/pg=artigo_tecnico). Acessado em 08/12/2008.

MORI, H.; SATO, Y.; TAKETOMO, N.; KAMIYAMA, T.; YOSHIYAMA, Y.; MEGURO, S.; SATO, H.; KANEKO, T. Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1959-1964, 1997.

MULLIÉ, C.; ODOU, M.F.; SINGER, E; ROMOND, M.B.; IZARD, D. Multiplex PCR using 16S r RNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. **FEMS Microbiology Letters**, v.222, p.129-136, 2003.

MUÑOZA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1715-1718, 1988.

MURTI, T.W.; BOUILLANNE, C. ; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M.J. Bacterial growth and volatile compounds in yogurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* spp. **Journal of Food Science**, v.58, p.153-156, 1993.

NAGENDRA, R.; VISWANATHA, S.; KUMAR, S.A.; MURTHY, B.K.; RAO, S.V.. Effect of feeding milk formula containing lactulose to infants on fecal bifidobacterial flora. **Nutrition Research**, v.15, p.15024, 1995.

NEBRA, Y.; BLANCH, R. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5173-5176, 1999.

NEWMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: "in vitro" susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.59-65, 1995.

ORBAN, J.I.; PATTERSON, J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p.221-224, 2000.

ORDÓÑEZ, J.A.; ÁLVAREZ, M.I.C.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S.. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279p.

O'RIODAN, K.; FITZGERALD, G.F. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. **FEMS Microbiology Letters**, v.156, p.259-264, 1997.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; ADACHI, T.; SAKATA, T.; SAKAGUCHI, E. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **Journal of Nutrition**, v.125, p.2417-2424, 1995.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G.. Effect of Milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.

- PACHER, B.; KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **International Dairy Journal**, v.6, p.43-64, 1996.
- PAGLIARINI, E.; SOLAROLI, G.; PERI, C.. Chemical and physical characteristics of mare's milk. **Italian Journal of Food Science**, v.4, p.323-333, 1993.
- PELLETIER, C.; BOULEY, C.; CAYUELA, C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M.N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1725-1731, 1997.
- PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P.K., Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, p.993-1002, 1998.
- RADA, V.; DLABAL, J. Susceptibility of bifidobacteria to nisin. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.123-125, 1998.
- RADA, V.; PETR, J. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. **Veterinary Medicine – Czech**, v.47, p.104, 2002.
- RAMOS, M.P.P.; FERREIRA, C.L.L.F.; BRANDÃO, S.C.C.; FURTADO, M.M.; MININ, V.P.R. Viabilidade de *Bifidobacterium longum* em leite esterilizado e armazenado sob refrigeração. **Higiene Alimentar**, v.17, p.85-88, 2003.
- REIS, F.G.; WOLF, B.; SANTOS, D.A.; NEVES, C.N.; SALVA, T.J.G.; MORENO, I.; LERAYER, A.L. Seleção de bactérias lácticas resistentes a sais biliares. **Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, MG, Brasil : EPAMIG/CEPE/ILCT, p.102-107, 1998.
- REQUENA, T.; BURTON, J.; MATSUKI, T.; MUNRO, K.; SIMON, M.A.S.; TANAKA, R.; WATANABE, K.; TANNOCK, G.W. Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2420-2427, 2002.
- RIEL, R. **Composición y estructura físico-química de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991, p.1-54.
- ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v.130(Suppl), p.396S-402S, 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.
- ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *Idh* gene. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, p.17-24, 2000.
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of sweetening agents on the growth and survival of *Bifidobacterium* spp. **Journal of Dairy Science**, v.76(suppl,1), p.120, 1993.

SAMONA, A.; ROBINSON, R.K.; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yogurt bacteria during fermentation and storage of Milk. **Food Microbiology**, v.13, p.275-280, 1996.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v.17, p. 1284-1289, 2007.

SATOKARI, R.M.; VAUGHAN, E.E.; AKKERMANS, A.D.L.; SAARELA, M.; DE VOS, W. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.504-513, 2001.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.213-219, 1998.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins MD, Baltimore: 1418-1434, 1986.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal Food Technology**, v.2, p.7-19, 1999.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: Wood, B.J.B.; Holzapfel, W.H. (Ed), **Genera of Lactic Acid Bacteria**, London: Blackie Academic & Professional, 1995, 398p.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000

SHAH, N.P. Functional foods form probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v.55, p.46-52, 2001.

SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA, K. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.131-136, 2003.

SHIMAMURA, S.; ABE, F.; ISHIBASHI, N.; MIYAKAWA, H.; YAESHIMA, T.; ARAYA, T.; TOMITA, M. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.3296-3306, 1992.

SILVI, S. EU Project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.195-200, 2003.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysis: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, p.1484-1491, 2007.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 1991, 617p.

SUGANO, M.; SUGANO, M.; GOTO, S.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUO, T.; KIMOTO, M. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **Journal of Nutrition**, v.120, p.977-985, 1990.

SUN, W.; GRIFFITHS, M.W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Journal of Food Technology**, v.61, p.17-25, 2000.

TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1107-1114, 2007.

TABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v.1, Brasil: Nestlé Ltda, p.3-11, 2000.

TAHRI, K.; CROCIANI, J.; SCHNEIDER, F. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.149-151, 1995.

TAKAHASHI, N.; XIAO, J-Z.; MIYAJI, K.; YAESHIIMA, T.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.340-345, 2004.

TALWALKAR, A.; TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; ARUMUGASWAMY, R. Application of RBGR a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.245-248, 2001.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2537-2546, 2003.

TAPIA, J.A.R. Ecologia microbiana del tracto digestivo em la etapa neonatal. **Revista Mexicana de Pediatría**, v.69, p.257-260, 2002.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M.; MENEZES, L.D.M. Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.264-267, 2007.

TESHIMA, E.D.S. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. 2001. 113p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

TORTELLI, S. **Desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas utilizando como substrato extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite**. 2002. 75p. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Erechim-RS.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1058-1069, 2003.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v.1. Brasil: Nestlé Ltda, 2000, p.3-11.

TRONCO, V.M. Propriedades físico-químicas do leite e sua aplicação tecnológica. **Leite & Derivados**, v.27, p. 41-43, 1996.

VAUGIEN, L.; PREVOTS, F.; ROQUES, C. Bifidobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis. **Anaerobe**, v.8, p.341-344, 2002.

VENEMA, K.; MAATHUIS, A.J.H. A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p.143-149, 2003.

VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, v.36, p.113-121, 2001.

VENTURA, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2760-2765, 2001.

VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6429-6434, 2002.

VERNAZZA, C.L.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.846-853, 2006.

VILELA, D.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L.A. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001, 184p.

VINCENT, D.; ROY, D.; MONDOU, F.; DERY, C. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.185-193, 1998.

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.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microbiota in Argentinian Fresco Cheese. **Journal Dairy Science**, v.83, p.1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, p.579-589, 2002.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C.E. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1242-1247, 1996.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. **Food Microbiology**, v.19, p.501-508, 2002.

WARD, P.; ROY, D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. **Lait**, v.85, p.23-32, 2005.

WOLF, B.W.; FIRKINS, J.L.; ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. **Nutrition Research**, v.18, p.1791-1806, 1998.

WOLIN, M.J.; YERRY, S.; MILLER, T.L.; ZHANG, Y.; BANK, S. Changes in production of ethanol, acids and H<sub>2</sub> from glucose by fecal flora of a 16- to 158-d-old breast-fed infant. **Journal of Nutrition**, v.128, p.85-90, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical Reports Series**, n. 97, 1955. Disponível em: <<http://www.who.int/publications/en>>. Acessado em: 22/11/2008.

YAESHIMA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.303-313, 1996.

YAMAMOTO, T.; MOROTOMI, M.; TANAKA, R. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.4076-4079, 1992.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Food Protection**, v.6, n.47-51, 1998.

YILDIRIM, Z.; WINTERS, D.; JOHNSON, M. Purification, amino acid sequences and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.45-54, 1999.

YOUN, S.Y.; SEO, J.M.; JI, G.E. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. **Letters Applied Microbiology**, v.46, p.7-13, 2008.

ZAVAGLIA, A.G.; KOCIUBINSKI, G.; PÉREZ, P.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G.<sup>1</sup> Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.794-799, 2002.

## **Anexo 1– Tabelas dos resultados das análises**



## TABELAS DOS RESULTADOS

### Resistência à bile:

**Tabela 9.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em caldo MRS (meio controle) e em caldo MRS adicionado de 0,3% de bile (*Oxgall* – meio teste), em tempo zero e após 6 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL) no meio controle		Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL) no meio teste Bile ( <i>Oxgall</i> )	
	0 h	6 h	0 h	6 h
I-6	$2,1 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
I-17	$1,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
I-20	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$

### Resistência ao suco gástrico:

**Tabela 10.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em suco gástrico artificial, em tempo zero e após 90 e 180 minutos de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)		
	0	90	180
I-6	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
I-17	$1,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
I-20	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$

### Tolerância à acidez:

**Tabela 11.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em meio ácido formulado a pH 4,5 ( $\pm 0,2$ ), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)	
	0	24
I-6	$3,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
I-17	$3,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
I-20	$3,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$

### Exposição ao oxigênio:

**Tabela 12.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana após incubação em anaerobiose ou em aerobiose seguida de anaerobiose, em tempo zero, após 72 horas e após 96 horas mais 72 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Condições de incubação/ Tempo (horas)				
	Anaerobiose/ 0	Anaerobiose/ 72	Aerobiose/ 0	Aerobiose/ 96	Aerobiose/96 e anaerobiose/72
I-6	$3,2 \times 10^8$	$2,7 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
I-17	$3,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$
I-20	$3,0 \times 10^8$	$9,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$

### Crescimento em leite:

**Tabela 13.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em leite, em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)	
	0	24
I-6	$2,5 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$
I-17	$2,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$
I-20	$2,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$

### Crescimento em extrato de soja:

**Tabela 14.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em extrato de soja, em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)	
	0	24
I-6	$2,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{10}$
I-17	$2,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^{10}$
I-20	$2,3 \times 10^8$	$4,4 \times 10^9$

### Crescimento em soro de queijo:

**Tabela 15.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em soro de queijo, em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)	
	0	24
I-6	$2,5 \times 10^8$	$8,9 \times 10^8$
I-17	$2,3 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$
I-20	$2,3 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$

### Crescimento junto às bactérias do iogurte:

**Tabela 16.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas de amostras de origem humana e inoculadas em caldo MRS adicionado de 1% da cultura do iogurte, em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Cepas de bifidobactérias isoladas	Tempo (horas) /Células viáveis (UFC/mL)	
	0	24
I-6	$2,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^9$
I-17	$2,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
I-20	$2,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$

### Crescimento na presença de sal (NaCl):

**Tabela 17.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de NaCl (controle) e em caldo MRS adicionado de 1% e 2% de NaCl (testes), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de sal	Controle		Testes			
	Sem sal		1 %		2 %	
	0	24	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	$0,5 \times 10^8$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$0,6 \times 10^8$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$

### Crescimento na presença de sacarose:

**Tabela 18.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de sacarose (controle) e em caldo MRS adicionado de 8% e 12% de sacarose (testes), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de sacarose	Controle		Testes			
	Sem sacarose		8 %		12 %	
Tempo (horas)	0	24	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$3,9 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$3,9 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$3,6 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de lactose:

**Tabela 19.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de lactose (controle) e em caldo MRS adicionado de 8% e 12% de lactose (testes), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de lactose	Controle		Testes			
	Sem lactose		8 %		12 %	
Tempo (horas)	0	24	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$3,1 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de acesulfame

**Tabela 20.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de acesulfame (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,035g/100g de acesulfame (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de acesulfame	Controle		Testes	
	Sem acesulfame		0,035g/100g	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de aspartame:

**Tabela 21.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de aspartame (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,075g/100g de aspartame (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de aspartame	Controle		Testes	
	Sem aspartame		0,075g/100g	
	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de ciclamato:

**Tabela 22.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de ciclamato (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,13g/100g de ciclamato (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de ciclamato	Controle		Testes	
	Sem ciclamato		0,13g/100g	
	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de sacarina:

**Tabela 23.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de sacarina (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,03g/100g de sacarina (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de sacarina	Controle		Testes	
	Sem sacarina		0,03g/100g	
	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de carmin:

**Tabela 24.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de carmin (controle) e em caldo MRS adicionado de 100 mg/kg de carmin (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de carmin	Controle		Testes	
	Sem carmin		100 mg/kg	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de vermelho ponceau:

**Tabela 25.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de vermelho ponceau (controle) e em caldo MRS adicionado de 50 mg/kg de vermelho ponceau (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de vermelho ponceau	Controle		Testes	
	Sem vermelho ponceau		50 mg/kg	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de cúrcuma:

**Tabela 26.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de cúrcuma (controle) e em caldo MRS adicionado de 80 mg/kg de cúrcuma (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de cúrcuma	Controle		Testes	
	Sem cúrcuma		80 mg/kg	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$
I17	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I20	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de flavorizante de pêssego:

**Tabela 27.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de flavorizante de pêssego (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,5% de flavorizante de pêssego (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de flavorizante de pêssego	Controle		Testes	
	Sem flavorizante de pêssego		0,5%	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de flavorizante de morango:

**Tabela 28.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de flavorizante de morango (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,5% de flavorizante de morango (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de flavorizante de morango	Controle		Testes	
	Sem flavorizante de morango		0,5%	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de flavorizante de baunilha:

**Tabela 29.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de flavorizante de baunilha (controle) e em caldo MRS adicionado de 0,5% de flavorizante de baunilha (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de flavorizante de baunilha	Controle		Testes	
	Sem flavorizante de baunilha		0,5%	
Tempo (horas)	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de polpa de pêssego:

**Tabela 30.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de polpa de pêssego (controle) e em caldo MRS adicionado de 5% de polpa de pêssego (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de polpa de pêssego	Controle		Testes	
	Sem polpa de pêssego		5%	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de polpa de morango:

**Tabela 31.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de polpa de morango (controle) e em caldo MRS adicionado de 5% de polpa de morango (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de polpa de morango	Controle		Testes	
	Sem polpa de morango		5%	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de goma xantana:

**Tabela 32.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de goma xantana (controle) e em caldo MRS adicionado de 5 g/kg de goma xantana (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de goma xantana	Controle		Testes	
	Sem goma xantana		5 g/kg	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$



### Crescimento na presença de goma guar:

**Tabela 33.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de goma guar (controle) e em caldo MRS adicionado de 5 g/kg de goma guar (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de goma guar	Controle		Testes	
	Sem goma guar		5 g/kg	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de amido:

**Tabela 34.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de amido (controle) e em caldo MRS adicionado de 1% de amido (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de amido	Controle		Testes	
	Sem amido		1%	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de amido de milho modificado:

**Tabela 35.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de amido modificado (controle) e em caldo MRS adicionado de 1% de amido modificado (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de amido modificado	Controle		Testes	
	Sem amido modificado		1%	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^{10}$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^{10}$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{10}$

### Crescimento na presença de nisina:

**Tabela 36.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de nisina (controle) e em caldo MRS adicionado de 12,5 mg/kg de nisina (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de nisina	Controle Sem nisina		Testes 12,5 mg/kg	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^6$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^6$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$

### Crescimento na presença de lisozima:

**Tabela 37.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de lisozima (controle) e em caldo MRS adicionado de 25 mg/L de leite de lisozima (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL

Concentração de lisozima	Controle Sem lisozima		Testes 25 mg/L leite	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$

### Crescimento na presença de sorbato de potássio:

**Tabela 38.** Médias das contagens de células viáveis das bifidobactérias isoladas após inoculadas em caldo MRS sem adição de sorbato de potássio (controle) e em caldo MRS adicionado de 1000 mg/kg de sorbato de potássio (teste), em tempo zero e após 24 horas de incubação, em UFC/mL:

Concentração de sorbato de sódio	Controle Sem sorbato de sódio		Testes 1000 mg/kg	
	0	24	0	24
I6	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$
I17	$1,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$
I20	$1,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)