

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

NADJA FERNANDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)**

Vitória de Santo Antão

2016

NADJA FERNANDES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Graduação em Nutrição do Centro
Acadêmico de Vitória da Universidade
Federal de Pernambuco em
cumprimento a requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Nutrição, sob orientação da Professora
Dra. Christine Lamenha Luna Finkler.

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

S586c Silva, Nadjia Fernandes da.
Caracterização *in vitro* de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas (BAL) / Nadjia Fernandes da Silva. Vitória de Santo Antão, 2016.
50 folhas: il.; graf.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler.
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Bacharelado em Nutrição, 2016.
Inclui referências.

1. Alimentos funcionais. 2. Probióticos . I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Título.

613.2 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-123/2016

Folha de aprovação

Nome do aluno(a): Nadja Fernandes da Silva

Titulo: Caracterização *in vitro* de Propriedades Probióticas de Bactérias Ácido Láticas (BAL)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição

Data:

Nota:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Finkler
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Zelyta Pinheiro de Faro
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ma. Alicinez Guerra Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, por todo amor e proteção.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proteger e me dar força e coragem para alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV) e ao Núcleo de Nutrição, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Christine Lamenha Luna Finkler, por todo ensinamento, incentivo, disponibilidade e apoio durante a realização deste trabalho, e também por ser uma excelente professora e profissional.

À minha vó, Dona Ivonete, meu exemplo, minha guerreira, a quem dedico esta conquista. Obrigada por me educar e me mostrar a importância da humildade, dignidade e perseverança.

À minha mãe, Maria Cunha, por todo cuidado, amor e dedicação, e ao meu pai, José Carlos, por compreender minhas ausências e me incentivar a buscar meus sonhos.

Ao meu namorado, Eronaldo Soares, por todo amor, carinho, paciência e apoio emocional durante a correria de cada semestre.

A toda minha família, a qual sempre me ajudou e acompanhou de perto todas as dificuldades enfrentadas e conquistas alcançadas durante a minha caminhada.

À equipe do laboratório de Bioprocessos, por toda colaboração e pela disposição que sempre tiveram em me auxiliar. Um agradecimento especial a Katharine Angélica, pela experiência e competência que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os professores do curso, os quais foram peças importantes no processo de formação intelectual e profissional.

Aos membros banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições.

Aos meus colegas de turma pela amizade, confiança, união e pelos bons momentos que passamos juntos.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram e estiveram presentes nesta trajetória,

Meus sinceros agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, produzem efeitos benéficos à saúde do indivíduo. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial probiótico de três cepas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e isolado FIL 01) empregadas em alimentos probióticos. Os métodos utilizados foram a avaliação *in vitro* da estabilidade das cepas frente à acidez gástrica, à bile e às enzimas digestivas, análise *in vitro* da capacidade de adesão e colonização das cepas à mucosa intestinal e observação da presença de atividade antimicrobiana. A análise da capacidade de resistência das cepas ao trato gastrointestinal mostrou alta instabilidade frente ao pH 2,0 e à ação da pepsina, uma vez que houve perda de 100% da viabilidade celular nas primeiras duas horas do ensaio. Em relação à propriedade de adesão e colonização da mucosa intestinal, as melhores características foram expressas pelo *Lactobacillus rhamnosus*, seguida por *Lactobacillus paracasei*. O isolado FIL 01 foi o que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade. Quanto à capacidade de produção de compostos antimicrobianos, observou-se que nenhuma cepa empregada neste estudo foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores. Pelo fato da resposta e atuação das cepas sofrerem interferências de diversos fatores do hospedeiro e do tipo de alimento veículo utilizado, sugerem-se pesquisas futuras que incorporem as cepas em alimentos e realizem ensaios *in vivo* para melhor estimar a capacidade probiótica das cepas.

Palavras-chave: Probiótico. Viabilidade. Funcionalidade.

ABSTRACT

The probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts, have beneficial effects on health of the individual. The purpose of this study was to analyze the probiotic potential of three strains (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* and isolated FIL 01) used in probiotic foods. The methods used were the *in vitro* evaluation of stability of front strains to gastric acid, to bile and digestive enzymes, *in vitro* analysis of adhesion capacity and colonization of the strains to the intestinal mucosa and observation of the presence of antimicrobial activity. The analysis of the resistance capacity of the strains to the gastrointestinal tract showed high instability against pH 2.0 and pepsin action, since there was a loss of 100% of cell viability in the first two hours of the assay. Regarding the property of adhesion and colonization of the intestinal mucosa, the best characteristics were expressed by *Lactobacillus rhamnosus*, followed by *Lactobacillus paracasei*. The FIL 01 isolate was the least likely to demonstrate the hydrophobicity characteristic. Regarding the production capacity of antimicrobial compounds, it was observed that no strain used in this study was able to inhibit the growth of the pathogens used as indicators. Due to the fact that the response and action of the strains are influenced by different factors of the host and the type of food used, future research is suggested that incorporate the strains into foods and perform *in vivo* assays to better estimate the probiotic capacity of the strains.

Key words: Probiotic. Viability. Functionality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Resultado da coloração de Gram

Figura 2- Resultado do teste da atividade de catalase

Figura 3- Capacidade de resistência das cepas *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e FIL 01 ao trato gastrointestinal

Figura 4- Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e FIL 01

Figura 5- Resultado do ensaio antimicrobiano

Tabela 1- Produção de substâncias antimicrobianas pelos cultivos de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do isolado FIL01

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactérias Ácido lácticas
BSH	Hidrolase de Sais Biliares
DOA	Densidade Ótica A
DOB	Densidade Ótica B
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FOSHU	Foods for Specified Health Use
FFC	Centro de Alimentos Funcionais
mL	mililitros
µl	microlitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
Geral:	15
Específicos:	15
4 REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1 Alimentos Funcionais	16
4.1.1 Contextualização e Definição	16
4.1.2 Legislação para alimentos funcionais	17
4.2 Probióticos	18
4.2.1 Histórico e Definição	18
4.2.2 Benefícios à saúde	18
4.2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL)	21
4.2.4 Propriedades intrínsecas	22
4.2.5 Legislação para probióticos	24
4.3 Alimentos que veiculam microrganismos probióticos	25
4.3.1 Filmjolk	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Microrganismos	27
5.1.1 Etapa de reativação e isolamento do Filmjolk	27
5.2 Testes para caracterização do isolado FIL01	28
5.3 Manutenção das cepas	28
5.4 Teste <i>in vitro</i> de tolerância gastrointestinal	28
5.2 Teste de hidrofobicidade	29
5.3 Atividade antimicrobiana	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1 Caracterização do isolado FIL01	32
6.2 Teste <i>in vitro</i> de tolerância gastrointestinal	32
6.3 Teste de hidrofobicidade	35
6.4 Atividade antimicrobiana	36
8 CONCLUSÕES	40
9 REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A influência de hábitos alimentares saudáveis na manutenção da saúde e prevenção de doenças é um assunto que têm ganhado importante destaque nos dias atuais. A percepção dos consumidores sobre os efeitos prejudiciais de uma alimentação desequilibrada despertou uma crescente busca por alimentos que, além de fornecerem os nutrientes básicos, apresentem algum benefício específico à saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2002; ANNUNZIATA, VECCHIO, 2011).

Neste contexto se enquadram os alimentos funcionais, que são definidos como quaisquer alimentos ou ingredientes que, devido aos seus componentes fisiologicamente ativos, possam proporcionar algum benefício à saúde, além da função nutricional básica (MORAES, COLLA, 2006; SILVEIRA, VIANNA, MOSEGUI, 2009).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os alimentos e ingredientes que possuem alegações de propriedade funcional ou de saúde comprovados atualmente são os ácidos graxos, carotenóides, fibras alimentares, polióis, proteína de soja e probióticos (BRASIL, 2016). Dentre esta variedade de ingredientes e produtos alimentícios, destacam-se os probióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, produzem efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002). Entretanto, para acarretar tais resultados, é necessário que a quantidade mínima viável do microrganismo esteja entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008; BRASIL, 2002; VANDENPLAS, HUYS, DAUBE, 2015).

Além da característica anterior, os probióticos devem possuir algumas propriedades, tais como: resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano, como a acidez gástrica, o ácido biliar e a ação das enzimas digestivas; fazer parte da microbiota residente do aparelho digestivo humano, sendo, portanto, considerado não patogênico e seguro para o consumo humano; não possuir genes que levem a resistência a antibióticos; ser capaz de aderir e colonizar

a mucosa intestinal, ao menos temporariamente; ser metabolicamente ativo no intestino e apresentar atividade antimicrobiana (SAAD, 2006; NOGUEIRA, GONÇALVES, 2011; RANADHEERA *et al.*, 2012; RAMÍREZ *et al.*, 2011).

Os benefícios à saúde propostos pelos probióticos são baseados no conhecimento de que a microbiota intestinal pode proteger os indivíduos contra infecções e que o distúrbio dessas populações de microrganismos pode aumentar a suscetibilidade às infecções (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002). Dentre os benefícios incluem-se a modulação da microbiota intestinal (GUARNER, MALAGELADA, 2003; VANDENPLAS, HUYS, DAUBE, 2015); prevenção de quadros de diarreia e/ou constipação (TABBERS *et al.*, 2011; SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002); tratamento dos sintomas relacionados com a intolerância à lactose (PINTO *et al.*, 2015; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002); aumento da resposta do sistema imunológico (MEYER *et al.*, 2006; COPPOLA, GIL-TURNES, 2004; PASCHOAL *et al.*, 2007) e outros possíveis efeitos (melhora das reações alérgicas, redução dos lipídeos séricos, prevenção contra o câncer de cólon, entre outros) (FAO/WHO, 2001; MORAIS, JACOB, 2006; SHEHATA *et al.*, 2016; LI, 2012; DENIPOTE, TRINDADE, BURINI, 2010; LEBLANC, PERDIGÓN, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

O efeito positivo do consumo regular de alimentos probióticos é um assunto que já está estabelecido na literatura. Os benefícios à saúde são baseados no entendimento de que a microbiota intestinal pode proteger os indivíduos contra infecções e que o desequilíbrio entre as populações de microrganismos presentes na mucosa intestinal pode aumentar a suscetibilidade a doenças.

Por este motivo, é necessário que os microrganismos probióticos permaneçam viáveis no trato gastrointestinal humano após sua ingestão, sejam capazes de se multiplicar e colonizar a mucosa intestinal, bem como produzir compostos antimicrobianos para impedir a colonização de bactérias patogênicas.

Para um alimento ser considerado probiótico, o mesmo deve atender a alguns requisitos mínimos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dentre os quais estão o teste de tolerância ao trato gastrointestinal, a avaliação da capacidade de colonização da mucosa intestinal e a análise da produção de compostos antimicrobianos.

Considerando os aspectos mencionados acima, a avaliação prévia do potencial probiótico de uma cepa, utilizando os testes mencionados anteriormente, torna-se uma ferramenta indispensável no processo de reconhecimento e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em alimentos.

3 OBJETIVOS

Geral:

Analisar e comparar o potencial probiótico de três cepas empregadas em alimentos probióticos.

Específicos:

- Cultivar e isolar a cepa obtida do leite fermentado *filmjolk*;
- Caracterizar a cepa isolada do leite fermentado *filmjolk*;
- Reativar culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*;
- Avaliar *in vitro* a estabilidade das cepas frente à acidez gástrica, à bile e às enzimas digestivas;
- Analisar *in vitro* a capacidade de adesão e colonização das cepas à mucosa intestinal.
- Verificar presença de atividade antimicrobiana.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Alimentos Funcionais

4.1.1 Contextualização e Definição

A influência de hábitos alimentares saudáveis na manutenção da saúde e prevenção de doenças é um assunto que têm ganhado importante destaque nos dias atuais. A percepção dos consumidores sobre os efeitos prejudiciais de uma alimentação desequilibrada despertou uma crescente busca por alimentos que, além de fornecerem os nutrientes básicos, apresentem alguma característica de alegação funcional (OLIVEIRA *et al.*, 2002; ANNUNZIATA, VECCHIO, 2011).

O termo “alimentos funcionais” foi proposto primeiramente no Japão em 1984, em decorrência de uma pesquisa de grande escala sistemática financiada pelo governo, que tinha como objetivo a redução das despesas com a saúde pública. Tal termo foi descrito em 1991 como “Alimentos para uso específico de saúde” (Foods for Specified Health Use - FOSHU) (ARAI, 1996; STRINGHETA *et al.*, 2007; MARTIROSYAN, SINGH, 2015).

Os alimentos funcionais foram definidos inicialmente pelo Ministério da Saúde e Bem Estar japonês como sendo qualquer alimento que pudesse exercer determinado benefício à saúde, devido à relevância de seus constituintes, ou aqueles alimentos que tiveram seus alérgenos removidos, e ainda qualquer alimento que passou por alguma modificação cientificamente avaliada, seja a adição de novas substâncias ou a remoção de seus constituintes, para apresentar os benefícios esperados à saúde (GIBSON, WILLIANS, 2000).

De acordo com Martirosyan and Singh (2015), em 2014, o Centro de Alimentos Funcionais (FFC), localizado em Dallas (EUA) propôs uma nova definição para o termo alimento funcional, na qual eles são mencionados como alimentos naturais ou processados que contém compostos biologicamente ativos conhecidos ou não, que não apresentam efeitos tóxicos e que exercem benéficos à saúde clinicamente comprovados e documentados para a prevenção ou tratamento de doenças crônicas.

4.1.2 Legislação para alimentos funcionais

A legislação brasileira não estabelece uma definição para os alimentos funcionais, mas sim para a alegação de propriedade funcional ou de saúde (STRINGHETA *et al.*, 2007). De acordo com o Regulamento Técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde dos alimentos, a alegação de propriedade funcional refere-se ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente exerce no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Já a alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com determinada doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999; MORAES, COLLA, 2006). Excluem-se destas definições as alegações que façam referência à cura ou prevenção de doenças (SILVEIRA, VIANNA, MOSEGUI, 2009).

O alimento ou ingrediente que referir propriedades de alegação funcional ou de saúde deve, além de suas atribuições nutricionais normais, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos positivos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem acompanhamento médico e, além disso, ser enquadrado e devidamente registrado junto ao órgão competente (BRASIL, 1999; STRINGHETA *et al.*, 2007).

Constantemente a ANVISA avalia os pedidos para comprovação de propriedades de alegação funcional ou de saúde dos alimentos. Ela utiliza como base os requisitos mínimos e as evidências necessárias para comprovação da segurança e eficácia tanto dos novos alimentos que buscam um registro, quanto daqueles que estão passando por renovação do protocolo (BRASIL, 2016).

Nesse contexto, em março de 2016, a ANVISA publicou uma atualização da lista dos alimentos e ingredientes que possuem alegações de propriedade funcional ou de saúde. Nesta lista estão inclusos os ácidos graxos, carotenóides, fibras alimentares, polióis, proteína de soja e probióticos. Dentre as alterações que foram feitas a partir dessa atualização, destacam-se a atualização dos critérios básicos para a comprovação de segurança e eficácia de probióticos e a remoção da lista de microrganismos (BRASIL, 2016).

4.2 Probióticos

4.2.1 Histórico e Definição

A palavra probiótico, do grego “*pro*” e do latim “*bios*”, que significa “pró-vida”, foi introduzida inicialmente por Lilly e Stillwell em 1965 para descrever as substâncias secretadas por espécies de protozoários que estimularam o crescimento de outros organismos, sendo relatadas, portanto, como componentes opostos aos antibióticos (IANNITTI, PALMIERI, 2010; FULLER, 1989; LILLY, STILLWELL, 1965).

Os probióticos foram definidos primeiramente por Fuller (1989) como suplemento alimentar à base de microrganismos vivos que ocasiona benefícios ao hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Outro conceito, proposto por Havernaar e Huis In’t Veld (1992), descreve os probióticos como culturas únicas ou mistas de microrganismos viáveis que, administrados em animais ou humanos, produzem efeitos benéficos ao hospedeiro por melhoria das propriedades da microbiota nativa.

A definição de probióticos atualmente aceita internacionalmente é a que foi apresentada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em parceria com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), na qual eles são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, produzem efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002).

4.2.2 Benefícios à saúde

Os benefícios propostos pelos probióticos são baseados no conhecimento de que a microbiota intestinal pode proteger os indivíduos contra infecções e que o distúrbio dessas populações de microrganismos pode aumentar a suscetibilidade a doenças (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002). A seguir estão descritas as principais aplicações dos mesmos na saúde humana.

4.2.2.1 Modulação da microbiota intestinal

Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal através do mecanismo de exclusão competitiva, onde ocorre a adesão e colonização das mesmas à mucosa intestinal, impedindo a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas (GUARNER, MALAGELADA, 2003). Além disso, os probióticos competem com as bactérias patógenas pelos nutrientes fornecidos pela alimentação do hospedeiro e que estão disponíveis na mucosa. Os probióticos também podem impedir a multiplicação de seus competidores, através de compostos antimicrobianos (VANDENPLAS, HUYS, DAUBE, 2015).

4.2.2.2 Prevenção de diarreia

Pelo fato de regularem a microbiota intestinal, através dos mecanismos citados anteriormente, os probióticos previnem e/ou auxiliam no tratamento de diarreia associada a infecções ou ao tratamento com antibióticos. Alguns autores consideram que esse efeito seja dose-dependente ou cepa-dependente (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002).

4.2.2.3 Prevenção de constipação intestinal

A justificativa para tal benefício se dá principalmente pela capacidade dos probióticos diminuírem o tempo de trânsito intestinal, promovendo aumento no peso e volume das fezes, aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal, redução do pH, produção de gases, estímulo à produção de colecistocinina, redução do limiar de resposta à estímulo químico da musculatura lisa do ceco e metabolização bacteriana dos ácidos biliares liberados (TABBERS *et al.*, 2011).

4.2.2.4 Tratamento do quadro de intolerância à lactose

A utilização de probióticos como coadjuvante no tratamento da intolerância à lactose se baseia na melhoria do quadro clínico apresentado pelos pacientes. Os

microrganismos reduzem os efeitos indesejáveis causados pela intolerância à lactose através da melhora da digestão da lactose na luz intestinal, uma vez que os mesmos possuem a enzima β -D-galactosidase, a qual é ausente ou produzida em pequena quantidade pelos indivíduos intolerantes (PINTO *et al.*, 2015; OUWEHAND, SALMINEN, ISOLAURI, 2002).

4.2.2.5 Modulação da imunidade

A melhora da resposta imunológica após a ingestão regular de microrganismos probióticos está relacionada com a capacidade dos mesmos em ativarem os macrófagos, através do aumento nos níveis de citocinas, da atividade das células destruidoras naturais (NK - “natural killer”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (MEYER *et al.*, 2006; COPPOLA; GIL-TURNES, 2004). Adicionalmente, eles estimulam o desenvolvimento e maturação do sistema imune entérico e sistêmico (GALT e MALT) e promovem a alteração da relação entre citocinas pró e anti-inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , Interferon, IL-8) e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) (PASCHOAL *et al.*, 2007).

4.2.2.6 Melhora das reações alérgicas

Outro importante benefício atribuído ao consumo de alimentos probióticos é a redução de reações alérgicas a proteínas alimentares. Os mecanismos envolvem a indução da quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, o que possivelmente acarreta uma diminuição da sua alergenicidade (MORAIS, JACOB, 2006).

4.2.2.7 Prevenção contra câncer de cólon

O consumo de alimentos probióticos pode ocasionar em efeito protetor contra atividades carcinogênicas no cólon. Os mecanismos envolvem a inibição das bactérias responsáveis por converter substâncias pré-carcinogênicas (como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas) em carcinogênicas; a inibição direta da formação de células tumorais e capacidade de inativação da

carcinogênese (DENIPOTE, TRINDADE, BURINI, 2010). Outro mecanismo proposto é a possível capacidade dos probióticos em suprimir as enzimas β -glicuronidase e nitroredutase, produzidas por bactérias patogênicas. A redução dessas enzimas leva à hidrólise de compostos carcinogênicos e, conseqüentemente, diminuição das substâncias nocivas (LEBLANC, PERDIGÓN, 2005).

4.2.2.8 Redução do colesterol sérico

A atividade antiolesterolêmica proposta pelos probióticos apoia-se na atuação da enzima BSH, que ao catalisar a desconjugação dos sais biliares, desvia-o da circulação entero-hepática e estimula sua eliminação pelas fezes. Devido à excreção fecal, a reabsorção dos sais biliares fica comprometida e para compensar a perda, o corpo utiliza o colesterol endógeno para sintetizar novas moléculas de sais biliares, com isso a concentração sérica de colesterol é reduzida (SHEHATA *et al.*, 2016; LI, 2012).

4.2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL)

O emprego de bactérias lácticas na fermentação de alimentos é uma atividade praticada desde os tempos remotos (SHAH, 2007). Por serem habitantes normais do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis e apresentarem um baixo potencial patogênico, a incorporação das mesmas aos alimentos é considerada uma prática segura para o consumo humano (FAO/WHO, 2002).

As bactérias ácido lácticas compreendem um grupo representativo de microrganismos que apresentam características morfológicas, fisiológicas e metabólicas semelhantes (RAMÍREZ *et al.*, 2011). Geralmente apresentam-se como cocos ou bacilos gram-positivos, não esporulantes, desprovidos de flagelos, sem citocromos, anaeróbios ou microaerófilos, oxidase e catalase negativos e produzem ácido láctico como único ou principal produto da fermentação dos carboidratos, podendo produzir também dióxido de carbono, ácido acético e etanol (FAO/WHO, 2002; CARR, CHILL, MAIDA, 2002). Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (URNAU *et al.*, 2012; SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; SHAH, 2007).

O gênero *Lactobacillus* abrange 56 espécies reconhecidas oficialmente até o momento. As espécies pertencentes a este gênero possuem temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 40 °C e o pH ótimo de crescimento situa-se numa faixa entre 5,5 e 6,2. Há relatos de que o local de preferência de colonização intestinal desse grupo de bactérias seja o íleo terminal (NOGUEIRA, GONÇALVES, 2011; SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; MACEDO *et al.*, 2008;). Dentre as bactérias que mais se destacam estão *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. salivarius* (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; SAAD, 2006).

Atualmente, existem 30 espécies do gênero *Bifidobacterium*, as quais foram isoladas tanto de fontes humanas quanto de animais. A temperatura ótima de crescimento dessas bactérias varia entre 37 °C a 41 °C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25 - 28 °C e acima de 43 - 45 °C. O pH ótimo de crescimento oscila entre 6,0 a 7,0, não ocorrendo crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8,0 a 8,5. O cólon é relatado como sendo o local de preferência de colonização intestinal desse grupo de bactérias (NOGUEIRA, GONÇALVES, 2011; SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; MAZO *et al.*, 2009). As bactérias mais relevantes deste grupo são *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011; SAAD, 2006).

4.2.4 Propriedades intrínsecas

Para um microrganismo probiótico apresentar benefícios à saúde, ele deve possuir algumas características, tais como: resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano, como a acidez gástrica, o ácido biliar e à ação das enzimas digestivas; fazer parte da microbiota residente do aparelho digestivo humano, sendo, portanto, considerado não patogênico e seguro para o consumo humano; não possuir genes que levem a resistência a antibióticos; ser capaz de aderir e colonizar a mucosa intestinal, ao menos temporariamente; ser metabolicamente ativo no intestino e apresentar atividade antimicrobiana (SAAD, 2006; NOGUEIRA, GONÇALVES, 2011; RANADHEERA *et al.*, 2012; RAMÍREZ *et al.*, 2011).

As características de adesão à mucosa intestinal, tolerância ao trato gastrointestinal e a presença de atividade antimicrobiana serão abordadas com mais detalhes neste trabalho.

A aderência dos microrganismos probióticos à mucosa intestinal depende de interações reversíveis ou irreversíveis entre superfícies. O estágio inicial e reversível é mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que apesar de não serem consideradas específicas, são propriedades importantes (PELLETIER *et al.*, 1997).

Além disso, o processo de adesão inclui a atuação de forças atrativas e repulsivas das superfícies que entram em contato entre si e a ação de alguns elementos, como as adesinas bacterianas, composição da parede celular e receptores da mucosa intestinal (PÉREZ *et al.*, 1998). A interação entre todos esses fatores resulta na fixação da bactéria à mucosa e dificulta sua eliminação para o exterior do organismo através do peristaltismo intestinal e das correntes de fluidos (BARBOSA *et al.*, 2005).

A capacidade de resistência à acidez pelos microrganismos probióticos é atribuída à presença de um gradiente constante entre o pH extracelular e o pH citoplasmático. A partir do momento que o pH interno atinge valores limítrofes, as funções celulares são inibidas e a célula entra em apoptose (KASHKET, 1987). Os organismos Gram-positivos possuem uma enzima denominada *F0F1-ATPase*, a qual é responsável por proteger a célula das condições ácidas. A função de tal enzima nos organismos isentos de cadeia respiratória é gerar a força próton motiva, mediante expulsão de prótons, bem como acarretar um provável aumento do pH intracelular quando a célula se encontra em pH extracelular baixo (CORCORAN *et al.*, 2005).

Devido à propriedade emulsificante, os sais biliares podem ocasionar perda da integridade e da permeabilidade da membrana das bactérias, tanto pela capacidade de alterar a conformação das proteínas de membrana das bactérias, causando sua desnaturação, quanto pela habilidade de se ligarem aos lipídios das membranas (LI, 2012).

O mecanismo pelo qual os probióticos resistem aos sais biliares ainda não foi esclarecido, porém há suposições de que esta característica é decorrente da ação de uma enzima denominada hidrolase de sais biliares (BSH), que catalisa a desconjugação de sais biliares em ácidos biliares primários, que por sua vez liberam aminoácidos e colesterol, que podem ser utilizados como substrato pelos probióticos e auxiliarem na integridade da membrana celular bacteriana respectivamente (SHEHATA *et al.*, 2016; LI, 2012).

A atividade antimicrobiana dos probióticos é uma técnica empregada para eliminar, por meio de competição, as bactérias patogênicas ou inibir a atividade das mesmas. Os mecanismos de ação propostos envolvem a produção e liberação de compostos antimicrobianos, tais como ácidos graxos de cadeia curta e outros ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido acético, que reduzem o pH e aumentam o efeito bacteriostático; bacteriocinas, que são peptídeos produzidos por bactérias que possuem atividade bacteriostática ou bactericida; e espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, altamente reativos e que aumentam o estresse oxidativo dos microrganismos patogênicos (MAKRAS, VUYST, 2006; VANDENPLAS, HUYS, DAUBE, 2015; ARGYRI *et al.*, 2013).

4.2.5 Legislação para probióticos

A ANVISA é o órgão brasileiro que estabelece os requisitos mínimos necessários para comprovação da segurança e eficácia dos produtos probióticos. Em 2008 foi publicada uma lista dos microrganismos reconhecidos como probióticos e as exigências básicas para a comprovação da funcionalidade dos mesmos. Dentre os microrganismos da lista, estão o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus Lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*.

Em relação às exigências básicas, foi estabelecida a quantidade mínima viável para os probióticos desempenharem suas funções adequadamente, a qual varia entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores

menores podem ser aceitos, desde que a sua eficácia seja comprovada (BRASIL, 2008; BRASIL, 2002; VANDENPLAS, HUYS, DAUBE, 2015).

Uma nova atualização, realizada pela ANVISA em março de 2016, determina que as exigências mínimas necessárias para comprovação da alegação probiótica de um produto deva incluir:

- Caracterização do microrganismo (ex: gênero, espécie, origem);
- Perfil de resistência antimicrobiana;
- Determinação da atividade hemolítica, no caso de espécies com potencial hemolítico;
- Estudos dos efeitos adversos das cepas;
- Demonstração da eficácia, baseada em evidências científicas;
- Comprovação da viabilidade, através de laudo com a quantidade mínima viável do microrganismo necessária para exercer a propriedade de alegação funcional até o final da validade do produto.

4.3 Alimentos que veiculam microrganismos probióticos

O leite fermentado é o alimento mais empregado como veículo de microrganismos probióticos, sendo o mais popular e o mais consumido em todo o mundo (FONDÉN *et al.*, 2003). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), eles são definidos como produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica por meio da ação de cultivos de microrganismos específicos, os quais devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final ao longo do seu prazo de validade (BRASIL, 2007).

Os produtos lácteos fermentados são classificados em produtos de fermentação láctica de cepas de BAL mesófilas ou termófilas, produtos da fermentação alcoólica-láctica, a qual envolve levedura e BAL, e produtos resultantes da combinação dos dois tipos de fermentação citados anteriormente (SURONO, HOSONO, 2006).

Existem numerosos tipos de leites fermentados fabricados em diferentes partes do mundo. Cerca de 400 nomes são aplicados a métodos tradicionais e produtos lácteos fermentados em todo o planeta. A característica básica de cada tipo de leite fermentado resulta tanto do tipo de microrganismo utilizado, quanto das condições do processo de produção empregado (BATT; TORTORELLO, 2014).

4.3.1 Filmjölk

O Filmjölk é um tipo de leite fermentado tradicional da Suécia que surgiu no início dos anos 30. Apesar de ser um produto lácteo antigo, seu consumo médio anual ainda é considerado importante, uma vez que ultrapassa 10 Kg per capita (FONDÉN, LEPORANTA, SVENSSON, 2006; TAMIME, ROBINSON, 1988).

Por ser um produto de fermentação espontânea, a identidade exata das bactérias que compõem esse tipo de leite fermentado não está totalmente esclarecida. Alguns autores relatam que as cepas principais são *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. biovar diacetylactis e *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris* (TAMIME, 2006; FONDÉN, LEPORANTA, SVENSSON, 2006).

Em relação às propriedades do produto, o Filmjölk apresenta um teor de gordura variando entre 0,5 e 3 %, sabor suave, elevada viscosidade e um aroma intenso típico. Tais características são derivadas da formação de exopolissacarídeos, diacetilo e dióxido de carbono, que são produzidos pelo processo fermentativo (SURONO, HOSONO, 2006; RUAS-MADIEDO, HUGENHOLTZ, ZOON, 2002).

Através de estudos sobre a viabilidade desse leite fermentado, foi verificado que o mesmo se constitui num veículo viável para os probióticos, uma vez que o pH do produto e a taxa de sobrevivência das cepas se mantêm constante durante o período de armazenamento, o que permite um período de vida útil de até três semanas, se mantidas as condições adequadas de umidade e temperatura (SURONO, HOSONO, 2006; TAMIME, 2006).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

Foram empregadas três cepas probióticas que foram obtidas das seguintes formas:

- *Lactobacillus rhamnosus*: Adquirida a partir da coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos do Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.
- *Lactobacillus paracasei*: Isolado de um leite fermentado comercial.
- FIL 01: Isolado a partir de amostras desidratadas da cultura Filmjolk fornecida via correios por uma doadora de Fortaleza-CE e responsável pelo site Kefirbr.com.

5.1.1 Etapa de reativação e isolamento do Filmjolk

As culturas desidratadas foram reativadas em leite em pó integral diluído e incubadas em B.O.D. à 30 °C e a 37 °C durante 48 h. Após a fermentação do leite, as amostras foram diluídas (10^{-1}) e alíquotas de 100 µl foram semeadas em placas de Petri com meio de cultura MRS Ágar (acrescidos de 2 % p/v de glicose), utilizando a técnica de semeadura *pour plate* e semeadura de superfície. As amostras foram incubadas novamente em B.O.D. nas temperaturas de 30 °C e 37 °C durante 48 h.

Após a reativação das cepas, as colônias identificadas visualmente passaram por uma análise no microscópio e em seguida foram repicadas isoladamente em placas de Petri com o meio de cultura MRS Ágar (acrescidos de 2 % p/v de glicose), utilizando a técnica de semeadura *pour plate*. As colônias foram incubadas a 37 °C durante 48 h, e as cepas individuais foram confirmadas através de análise microscópica.

5.2 Testes para caracterização do isolado FIL01

5.2.1 Teste de atividade de catalase

Sobre lâminas de vidro foram adicionadas gotas de culturas líquidas contendo as cepas isoladas. Em seguida adicionou-se uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3 % sobre cada cepa e observou-se a formação imediata de bolhas de gás, que indica a presença da enzima catalase.

5.2.2 Coloração de Gram

Foi feito um esfregaço de cada cepa em lâminas de vidro com auxílio de alça bacteriológica. Com o objetivo de fixar o material, o esfregaço foi passado ligeiramente na chama do bico de Bunsen por três vezes. Posteriormente cobriu-se o esfregaço seco com solução cristal de violeta, deixou secar por um minuto e em seguida o material foi lavado em água corrente. Tal procedimento se repetiu com a solução de lugol. O passo seguinte foi pingar gotas de álcool-acetona durante trinta segundos e lavar com água corrente. Por fim, cobriu-se a lâmina com solução de fucsina por trinta segundos e lavou-a. Após a secagem suave com papel filtro, as mesmas foram examinadas em microscópio para identificação de células coradas.

5.3 Manutenção das cepas

Foram realizados repiques periódicos dos isolados selecionados para este estudo utilizando o meio de cultura caldo MRS (acrescidos de 2 % p/v de glicose), de acordo com o mesmo processo de incubação descrito na etapa de isolamento. Com o objetivo de conservar as cepas por um intervalo de tempo maior, as culturas isoladas foram congeladas com glicerol a 40 % e mantidas em uma temperatura aproximada de -20 °C por um período máximo de 6 meses.

5.4 Teste *in vitro* de tolerância gastrointestinal

A sobrevivência das células de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do isolado FIL01 foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados, utilizando-se pepsina,

pancreatina e bile. Os experimentos foram realizados com base nos procedimentos de Liserre *et al.* (2007), com modificações.

Inicialmente foi preparada uma solução de pepsina (3 g/L) em solução ácida (37,5 mL de HCl 1N, 1 g de NaCl em água destilada até completar 500 mL). O pH dessa solução foi ajustado para 2,0 usando uma solução de NaOH 1N.

Um volume de 2 mL de células centrifugadas foi lavado por duas vezes utilizando-se solução salina a 0,85 % (p/v). 1 mL desta suspensão celular foi adicionado à um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 30 mL da solução ácida contendo pepsina preparada anteriormente, sendo a mistura incubada a 37 °C em *shaker* por 120 min a 150 rpm.

Posteriormente, foram adicionados pancreatina (1 g/L) e bile (10 g/L) e o pH da amostra foi ajustado para 5,6. A mistura foi novamente incubada a 37 °C em *shaker* por 120 min a 150 rpm. Na última etapa, o pH foi elevado para 7,5 e as concentrações de pancreatina e bile foram ajustadas novamente para 1 g/L e 10 g/L, respectivamente. A mistura foi novamente incubada nas mesmas condições.

A contagem de células viáveis foi realizada mediante a retirada de amostras no início e no final de cada etapa, e as diluições das amostras foram realizadas empregando-se água peptonada a 0,1 % (p/v).

As soluções empregadas no ensaio foram esterilizadas por meio de filtração em membrana de 0,22 µm.

5.2 Teste de hidrofobicidade

Este ensaio foi realizado em triplicata, de acordo com as técnicas descritas por Rosenberg, Gutnick e Rosenberg (1980), Pelletier *et al.* (1997) e Pérez *et al.* (1998), com modificações.

Foram utilizadas cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei* e do isolado FIL01, cultivadas durante 48 h à 37 °C em Erlenmeyer com 100 mL de meio caldo MRS suplementado com 2 % (p/v) de glicose.

Os cultivos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos em tubos tipo Falcon. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com 10 mL de solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM, pH 7,0). O material remanescente do isolado FIL01 foi ressuspensão em 8 mL de solução de NaNO_3 (0,1 M, pH 6,2), enquanto que o do *L. rhamnosus* e *L. casei* foi ressuspensão em 32 mL da mesma solução.

Em seguida, 5 mL das suspensões bacterianas foram transferidos para tubos de vidro rosqueáveis e adicionou-se 1 mL dos seguintes solventes: xilol (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido) e acetato de etila (solvente básico). O material ficou em repouso por 5 minutos e logo depois as fases foram agitadas em vórtex por 2 minutos.

Após a agitação, os tubos permaneceram em repouso durante 60 minutos, e após a separação total das fases, foi feita a leitura de absorbância da fase aquosa a 600 nm em espectrofotômetro (Spectrum®).

O percentual de adesão das cepas, de acordo com o solvente utilizado, foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$H (\%) = \frac{(DOA - DOB) \times 100}{DOA}$$

Onde:

H (%) – grau de hidrofobicidade

DOA = Branco – 5 mL de solução de NaNO_3

Amostra – 5 mL de solução de NaNO_3 + Células

DOB = Branco – 4 mL de solução de NaNO_3 + 1 mL dos solventes em cada tubo

Amostra – 5 mL de suspensão celular em solução de NaNO_3 + 1 mL dos solventes em cada tubo.

5.3 Atividade antimicrobiana

Este ensaio foi realizado com base no método de disco-difusão descrito por Bauer *et al.* (1996), com adaptações. Os microrganismos patógenos testados foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus*

pyogenes clínica, os quais foram obtidos a partir da coleção do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco.

As cepas probióticas foram repicadas em meio caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24 h e os patógenos foram repicados em tubo inclinado contendo ágar nutriente e incubados a 37 °C por 24 h.

Para cada patógeno, foi preparada uma suspensão em solução salina estéril 0,85 % (p/v) com turvação compatível ao tubo 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com auxílio de *swabs* estéreis, as suspensões dos patógenos foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton e deixadas em repouso por aproximadamente 10 minutos para a completa absorção dos inóculos.

As cepas probióticas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado e as células foram ressuspensas em solução salina estéril 0,85 % (p/v).

Utilizando-se uma pinça, discos de papel mata-borrão (6 mm de diâmetro) foram embebidos nas amostras das células e do sobrenadante das bactérias probióticas e aplicados diretamente nas placas contendo o meio com os patógenos. Para o controle negativo e positivo, foi adicionado em cada placa um disco estéril e um disco de cloranfenicol 30µcg, respectivamente.

Após 24 h de incubação a 37 °C, a possível presença de atividade antimicrobiana foi detectada através da formação de halos em torno dos discos, os quais foram medidos com paquímetro e expressos em milímetros. Os resultados foram expressos em presença ou ausência de atividade, conforme tamanho dos halos de inibição.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do isolado FIL01

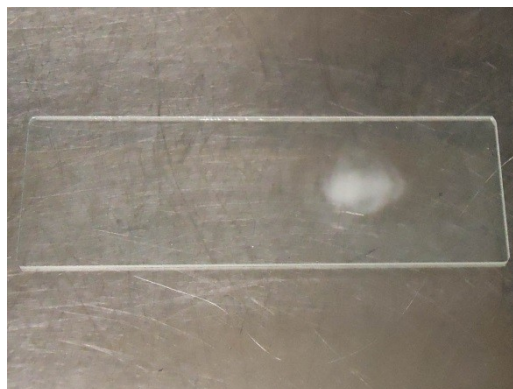
As Figuras 1 e 2 mostram o resultado dos testes utilizados para caracterizar a cepa FIL01 isolada do leite fermentado Filmjölök. Como pode-se observar, a cepa apresenta-se como cocos livres ou em cadeias, Gram-positivos e catalase negativos. Ensaio genéticos são necessários para esclarecer a identidade de tal cepa.

Figura 1. Resultado da coloração de Gram para a cepa isolada do leite fermentado Filmjölök



Fonte: A autora (2016).

Figura 2. Resultado do teste da atividade de catalase para a cepa isolada do leite fermentado Filmjölök



Fonte: A autora (2016).

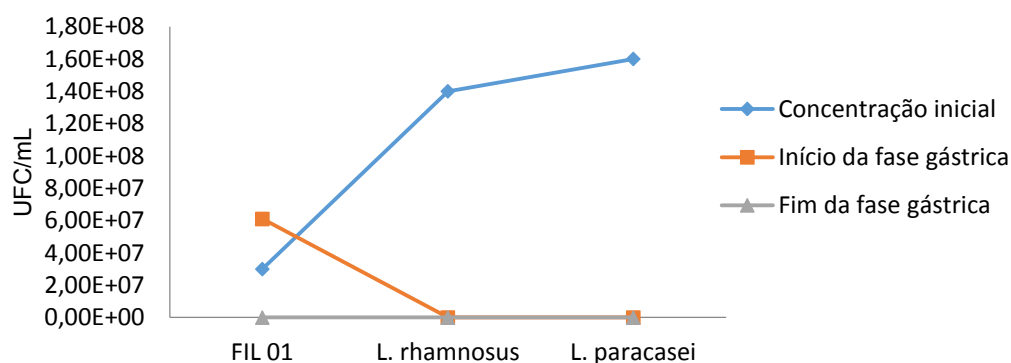
6.2 Teste *in vitro* de tolerância gastrointestinal

Um dos critérios básicos adotados para selecionar uma bactéria com potencial probiótico é a avaliação da sua capacidade de resistência às condições de

estresse presentes no trato gastrointestinal humano (SHEHATA *et al.*, 2016; KLU, CHEN, 2015; GARCIA *et al.*, 2016).

Dessa forma, foi analisada a capacidade de resistência das cepas *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e FIL01. Como pode-se observar na Figura 3, as cepas não se mostraram resistentes ao pH 2,0 e à ação da pepsina, uma vez que só se mantiveram viáveis no início da simulação da fase gástrica. Houve uma perda de 100 % da viabilidade celular nas primeiras duas horas do ensaio.

Figura 3- capacidade de resistência das cepas *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e FIL 01 ao trato gastrointestinal



Um resultado similar ao encontrado neste trabalho foi relatado por Garcia *et al.* (2016), onde foi avaliada a resistência de cinco espécies de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos de processamento de polpa de frutas. Foi visto que a exposição ao pH 2,0 acarretou uma redução acentuada nas contagens das diferentes cepas. Todas elas perderam a viabilidade total antes de 45 min de exposição, exceto *L. lactis* (ATCC 11454), que mostrou resistência até 180 min do ensaio, com uma redução de 2,5 log na viabilidade neste tempo.

Zárate *et al.* (2000) mostraram que a viabilidade de bactérias lácticas foi seriamente afetada quando submetidas a pH 2, corroborando com o resultado encontrado neste trabalho.

Já Handa e Sharma (2016), ao avaliar as propriedades probióticas do *L. plantarum* F22, encontraram alta tolerância a baixos valores de pH (1,0; 2,0 e 3,0) e aos sais biliares (0,3%).

Klu e Chen (2015), observaram a estabilidade de três espécies de bactérias probióticas, mesmo em pH de 1,6. Os autores estudaram o efeito de matrizes de manteiga de amendoim sobre a viabilidade dos probióticos e concluíram que ela pode ser considerada um alimento viável para incorporação de microrganismos probióticos, pois promove uma proteção contra o estresse presente no trato gastrointestinal.

Está comprovado que associação dos microrganismos probióticos com alimentos melhora a viabilidade dos mesmos durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012). Os alimentos que possuem um alto teor de gordura e de proteínas são capazes de proteger as bactérias do ácido do estômago, acarretando uma melhor sobrevivência ao trânsito intestinal (ZÁRATE *et al.*, 2000; KLU, CHEN, 2015).

A capacidade de resistência dos probióticos também sofre influência dos ingredientes utilizados no alimento veículo, como por exemplo, as substâncias prebióticas, como inulina, fruto-oligossacáridos, galacto-oligossacarídeos e lactulose (RANADHEERA *et al.*, 2012).

Em vista disso, não se pode afirmar precisamente que os microrganismos empregados neste estudo não possuem propriedade probiótica, posto que a tolerância dos probióticos ao trato gastrointestinal depende tanto de sua resistência intrínseca, quanto do tipo de alimento veículo empregado (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012), e neste caso as cepas foram analisadas isoladamente.

Além disso, a maioria dos trabalhos que relataram sobrevivência de cepas probióticas ao trato gastrointestinal, como o de Garcia *et al.* (2016) e o de Handa e Sharma (2016), utilizaram metodologias com ensaios isolados e não associaram os valores de pH e as enzimas envolvidas em cada fase da digestão, diferentemente do presente estudo.

6.3 Teste de hidrofobicidade

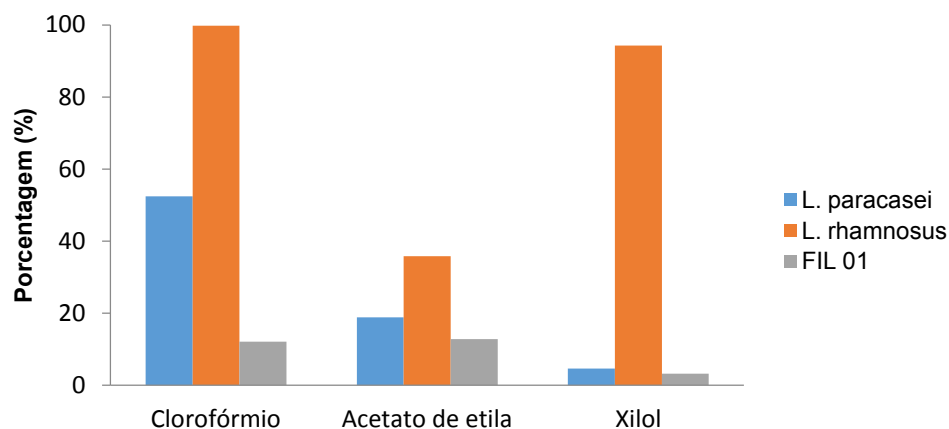
A colonização do epitélio intestinal por determinadas bactérias depende da capacidade de adesão das mesmas às células da mucosa intestinal (PELLETIER *et al.*, 1997). Esta é uma característica importante, pois é através do mecanismo de competição por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal que as bactérias probióticas exercem suas funções (PÉREZ *et al.*, 1998; BARBOSA *et al.*, 2005).

Um dos fatores determinantes na adesão microbiana à mucosa intestinal é a ocorrência de interações hidrofóbicas entre as membranas celulares da cepa e do hospedeiro (GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2014; BETORET *et al.*, 2016).

O presente estudo avaliou a capacidade *in vitro* de adesão e colonização das cepas *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do isolado FIL01 à mucosa intestinal. A Figura 4 mostra o comportamento de cada cepa frente aos diferentes tipos de solventes utilizados.

Os resultados foram expressos em percentual e as características ácido-básicas da parede celular das cepas foram analisadas através do grau de migração para a fase apolar (solvente xilol) e pela característica ácida ou básica da superfície celular (solventes clorofórmio e acetato de etila, respectivamente).

Figura 4 - Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e FIL 01



A cepa que expressou maior hidrofobicidade foi *Lactobacillus rhamnosus*, visto que a mesma apresentou um elevado grau de migração para a fase apolar

(94,25 %) e exibiu uma superfície celular mais ácida (99,78 %) e menos básica (35,78 %).

Já *Lactobacillus paracasei* apresentou uma baixa porcentagem de migração de células para a fase apolar (4,59 %), porém expressou uma superfície celular mais ácida (52,44%) e menos básica (18,81%).

O microrganismo que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade foi o isolado FIL 01, uma vez que esta cepa exibiu a menor porcentagem de migração de células para a fase polar (3,15 %) e uma superfície celular com cargas ácidas e básicas proporcionais (12,06 e 12,08 %, respectivamente).

Assim como neste estudo, variações do nível de hidrofobicidade entre cepas de lactobacilos foram relatadas por Vinderola e Reinheimer (2003), onde foram encontrados percentuais entre 10,9 % e 67,8 %, indicando que esta característica pode ser amplamente divergente dentro da mesma espécie.

Por outro lado, García-Cayuela *et al.* (2014) encontraram altos valores de hidrofobicidade (60 %) para todas as cepas de lactobacilos analisadas em seu estudo, o que corroborou com seu argumento que os lactobacilos normalmente possuem superfícies celulares de natureza mais hidrofóbica.

Santos *et al.* (2016) encontraram baixos valores de hidrofobicidade em cepas de lactobacilos isoladas da fermentação do cacau. O maior percentual foi 16,87 %, o que indica que a matriz da polpa de cacau interferiu na capacidade hidrofóbica das cepas.

Alterações no grau de hidrofobicidade das cepas são comuns e diversos fatores interferem nesta propriedade, tais como condições de cultivo, nível de crescimento, pH, temperatura, osmolaridade, entre outros (WANG, HAN, 2007; VINDEROLA, REINHEIMER, 2003).

6.4 Atividade antimicrobiana

A inibição de patógenos por bactérias probióticas é uma condição importante na manutenção de uma microbiota intestinal saudável e depende de mecanismos que envolvem a produção e liberação de compostos antimicrobianos (ácidos graxos

de cadeia curta e outros ácidos orgânicos, como o ácido lático e o ácido acético), bacteriocinas e espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (ARGYRI *et al.*, 2013; MAKRAS, VUYST, 2006).

A produção de tais compostos pelas bactérias probióticas pode exercer efeitos benéficos durante a conservação de alimentos e evitar a proliferação de patógenos veiculados pelos alimentos (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012).

Na tabela 1 são apresentados os resultados observados no ensaio antimicrobiano, onde foi analisada a capacidade inibitória das células livres e dos metabólitos de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do isolado FIL01 contra três patógenos utilizados como indicadores.

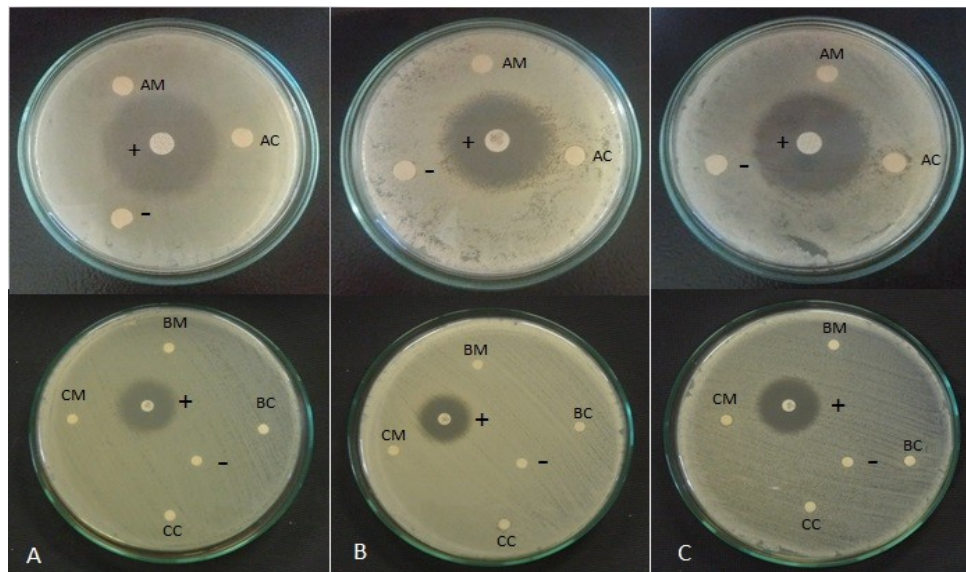
Tabela 1. Atividade antimicrobiana de células e líquido metabólico de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do isolado FIL01

Cepas indicadoras Amostra			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. pyogenes</i> clínica
<i>L. rhamnosus</i> (Célula)	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> (Metabólito)	-	-	-
<i>L. paracasei</i> (Célula)	-	-	-
<i>L. paracasei</i> (Metabólito)	-	-	-
FIL01 (Célula)	-	-	-
FIL01 (Metabólito)	-	-	-

Legenda: (-) atividade negativa

Apesar das bactérias ácido lácticas serem conhecidas como produtoras de compostos antimicrobianos (BALCÁZAR *et al.*, 2008), nenhuma cepa empregada neste estudo mostrou-se capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus pyogenes* clínica). A Figura 5 mostra o resultado do ensaio com mais detalhes.

Figura 5. Resultado do ensaio antimicrobiano



Legenda: A: *Escherichia coli*; B: *Staphylococcus aureus*; C: *Streptococcus pyogenes*; + controle positivo; - controle negativo; AC: célula do FIL01; AM: metabólito do FIL01; BC: célula de *L. rhamnosus*; BM: metabólito de *L. rhamnosus*; CC: célula de *L. paracasei*; CM: metabólito de *L. paracasei*.

Fonte: a autora (2016).

Resultados similares a este foram observados no estudo de Argyri *et al.* (2013), onde foi analisado o potencial probiótico de algumas bactérias lácticas e não foi constatado inibição do crescimento dos patógenos pelas cepas testadas. Balcázar *et al.* (2008) também mostraram que, de três cepas de bactérias lácticas avaliadas, apenas uma (Lactis CLFP 101) reduziu a adesão de todos os patógenos empregados em seu estudo.

Por outro lado, diversos estudos apontam a atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas. Andrade *et al.* (2014) avaliou a atividade antagonista de *Lactobacillus spp.* contra diversos patógenos, incluindo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Todos os patógenos tiveram seu crescimento inibido.

Garcia *et al.* (2016) examinaram a efetividade de cinco cepas de *Lactobacillus* em inibir bactérias patogênicas. Os resultados mostraram que todas as cepas foram capazes de inibir o crescimento dos patógenos, dentre as quais estão *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *S. aureus*.

Ao analisar a capacidade antimicrobiana de nove cepas de *Lactobacillus fermentum* isoladas de produtos lácteos, Bao *et al.* (2010) constataram que todas possuíram atividade contra cinco patógenos alimentares.

Além dos fatores mencionados anteriormente, Campaniello *et al.* (2015) sugerem que a atividade antimicrobiana poderia ser atribuída a baixos valores de pH, uma vez que a inibição de *E. coli* O157:H7 por propioniobactérias em seu estudo só foi possível em culturas celulares e sobrenadantes que apresentaram pH 4,5. Tanto as culturas celulares quanto os sobrenadantes que tiveram seu pH ajustado para 6,5 não apresentaram atividade inibitória.

Pereira e Gómez (2007) mostraram que a atividade antagonista de bactérias probióticas é dependente das condições de cultivo, como concentração de oxigênio no meio, temperatura empregada e período de incubação. Esses fatores interferem no pH e na quantidade de ácido láctico produzida, elementos sugeridos por eles como os responsáveis pela inibição. A máxima atividade antagonista observada pelos autores foi após 72 horas de incubação das cepas, a 37°C e em aerobiose.

Pelo fato do presente trabalho ter utilizado patógenos comuns do trato gastrointestinal humano como bactérias indicadoras, esperava-se que as amostras apresentassem algum nível de inibição do crescimento dos mesmos. Apesar disso, estudos adicionais são necessários para avaliar a capacidade antagonista das bactérias lácticas utilizando-se outras condições de cultivos e outros tipos de patógenos.

8 CONCLUSÕES

A análise da capacidade de resistência das cepas ao trato gastrointestinal mostrou alta instabilidade frente ao pH 2,0 e à ação da pepsina, uma vez que houve uma perda de 100% da viabilidade celular nas primeiras duas horas do ensaio.

Em relação à propriedade de adesão e colonização da mucosa intestinal, as melhores características foram expressas pelo *Lactobacillus rhamnosus*, visto que esta cepa apresentou a maior hidrofobicidade. Em contrapartida, *Lactobacillus paracasei* demonstrou uma razoável capacidade de colonizar a mucosa intestinal, pois apesar do baixo grau de migração para a fase apolar, ele exibiu uma superfície celular mais ácida. O microrganismo que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade foi o isolado FIL 01.

Quanto à capacidade de produção de compostos antimicrobianos, observou-se que nenhuma cepa empregada neste estudo foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores.

Deve-se levar em consideração que testes *in vitro*, apesar de serem ferramentas importantes no entendimento dos mecanismos e características intrínsecas das cepas, nem sempre expressam as condições *in vivo*, uma vez que diversos fatores do hospedeiro interferem no mecanismo de resposta e atuação das bactérias. Além disso, o alimento veículo dos microrganismos probióticos também é um fator que deve ser considerado.

Como perspectivas futuras, sugere-se a incorporação das cepas utilizadas neste estudo em alimentos e a realização de ensaios *in vivo* para melhor estimar a capacidade probiótica das cepas.

9 REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. R. G. *et al.* Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 5, p.1592-1600, out. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-6781>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal Of Functional Foods**, Napoli, Italy, v.3, n.3, p.223-228, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464611000375>>. Acesso em: 8 ago. 2016.

ARAI, S. Studies on Functional Foods in Japan - State of the Art. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, Tokyo, Japan, v. 60, n. 1, p.9-15, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824819>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

ARGYRI, A. A. *et al.* Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.282-291, abr. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

BALCÁZAR, J. L. *et al.* Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, Vigo, v. 278, n. 1-4, p.188-191, jun. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

BAO, Y. *et al.* Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.695-701, maio 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>>. Acesso em: 17 jan. 2016.

BARBOSA, F. H. F. *et al.* 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**, [s. L.], v. 5, n. 2, p.1-11, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/500/50050216.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2016.

BATT, C.; TORTORELLO, M. L. Encyclopedia of Food Microbiology. 2. ed. [s. L.]: **Academic Press**, 2014. 1014 p. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=1b1CAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt->

BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 17 ago. 2016.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BETORET, E. *et al.* Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-5, out. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816306314>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 out. 2015.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em 14 de março de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_02_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c>. Acesso em: 25 out. 2015.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 03 maio de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393821/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O%2BN%25C2%25BA%2B18.pdf/ff96b58a-e4f9-4d53-ba2e-e11a63dcf8f0>>. Acesso em: 25 out. 2015.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, n 205, seção 1, p.4. 24 out. 2007. Disponível em:

<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2016.

CAMPANIELLO, D. *et al.* Screening of *Propionibacterium* spp. for potential probiotic properties. **Anaerobe**, Foggia, v. 34, p.169-173, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.06.003>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.281-370, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546196>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, ago. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000400056&lang=pt>. Acesso em: 26 out. 2016.

CORCORAN, B. M. *et al.* Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. **Applied And Environmental Microbiology**, Ireland, v. 71, n. 6, p.3060-3067, 1 jun. 2005. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/71/6/3060>>. Acesso em: 26 out. 2016.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 47, n. 1, p.93-98, mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032010000100016&lang=pt>. Acesso em: 26 out. 2016.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. **Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 25 out. 2015.

_____. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Córdoba, Argentina, october, 2001. Disponível em: <<chrome-extension://oemmnndcblbdoiebfnladdacbfmadadm/http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2015.

FONDÉN, R. *et al.* Lactic acid bacteria (LAB) in functional dairy products. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products**. Cambridge:

Elsevier Science & Technology, 2003. Cap. 10. p. 255-262. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9781855735842>>. Acesso em: 07 set. 2016.

FONDÉN, R.; LEPORANTA, K.; SVENSSON, U. Nordic/Scandinavian Fermented Milk Products. In: TAMIME, Adnan. **Fermented Milks**. Ayr: Blackwell Science Ltd, 2006. Cap. 7. p. 156-173. Disponível em: <<https://ttnngmai.files.wordpress.com/2012/06/fermentedmilks.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2016.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Of Applied Bacteriology**, UK, v.66, n.5, p.365-378, maio 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>> Acesso em: 22 ago. 2016.

GARCÍA-CAYUELA, T. *et al.* Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, [s.l.], v. 57, p.44-50, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914000143>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

GARCIA, E. F. *et al.* Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.531-541, 30 ago. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01371/full#B36>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

GIBSON, G. R.; WILLIAN, C. M. (Eds.). FUNCTIONAL FOODS: Concept to product. Boca Raton (FL): **CRC Press**, Woodhead Publishing Limited, 2000. Disponível em: <http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Daneshkadaha/dbehdasht/behdasht_imani/book/Functional_Foods.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, [s. L.], v. 361, n. 9356, p.512-519, fev. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583961>>. Acesso em: 10 out. 2016.

HANDA, S.; SHARMA, N. *In vitro* study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, Nauni, v. 14, n. 1, p.91-97, jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.08.001>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

HAVENAAR, R.; VELD, J. H. J. H. Probiotics: A General View. **The Lactic Acid Bacteria Volume 1**, [s.l.], p.151-170, 1992. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_6>. Acesso em: 23 ago. 2016.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 29, n. 6, p.701-725, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561410000907>>. Acesso em: 13 set. 2016.

KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **Fems Microbiology Letters**, Boston, v. 46, n. 3, p.233-244, set. 1987. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223363634_Bioenergetics_of_lactic_acid_bacteria_cytoplasmic_pH_and_osmotolerance>. Acesso em: 26 out. 2016.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **Lwt - Food Science And Technology**, Georgia, v. 62, n. 2, p.983-988, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815001218>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

LEBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. Reduction of b-Glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, Mendoza, v. 29, n. 1, p.15-24, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-95452005000100003>. Acesso em: 26 out. 2016.

LI, G. Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. **Procedia Environmental Sciences**, Chongqing, China, v. 12, p.1180-1186, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029612004069>>. Acesso em: 01 ago. 2016.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, Jamaica, New York, v.147, n. 3659, p.747-748, 12 fev. 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14242024>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food Biotechnology**, London, v. 21, n. 1, p.1-16, 6 mar. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905430701191064>>. Acesso em: 30 set. 2016.

MAKRAS, L.; VUYST, L. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, Netherlands, v. 16, n. 9, p.1049-1057, set. 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605001779>>. Acesso em: 26 out. 2016.

MACEDO, L. N. *et al.* Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p.935-942, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000400027>. Acesso em: 08 set. 2016.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. **Functional Foods In Health And Disease**, Dallas, Usa, v. 6, n. 5, p.209-223, 2015. Disponível em: <<http://functionalfoodscenter.net/files/105582267.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

MAZO, J. Z. *et al.* BIFIDOBACTÉRIAS: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO EM ALIMENTOS PROBIÓTICOS. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 1, p.119-134, 12 ago. 2009. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/14958>>. Acesso em: 01 ago. 2016.

MEYER, A. L. *et al.* Daily Intake of Probiotic as well as Conventional Yogurt Has a Stimulating Effect on Cellular Immunity in Young Healthy Women. **Annals Of Nutrition And Metabolism**, Basel, v. 50, n. 3, p.282-289, 1 jun. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508257>>. Acesso em: 26 out. 2016.

MONTEAGUDO-MERA, A. *et al.* In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal Of Functional Foods**, León, v. 4, n. 2, p.531-541, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612000394>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.99-112, 2006. Disponível em: <<http://www.sausedireta.com.br/docsupload/1356828224Nutreceuticos.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, Porto Alegre, v. 82, n. 8, p.189-197, 06 nov. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2223/jped.1559>>. Acesso em: 23 ago. 2016.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.487-492,

01 out. 2011. Disponível em:

<<http://www.biblionline.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/view/8201>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

OLIVEIRA, M. N. de *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo**, v.38, n.1, p.1-21, mar. 2002. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=pt&nrm=iso&tling=pt>. Acesso em: 10 ago. 2016.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Best Practice And Research Clinical Gastroenterology**, Netherlands, v. 82, n. 1, p.279-289, 2002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369194>>. Acesso em: 30 out. 2016.

PASCHOAL, V. *et al.* Nutrição clínica funcional: dos princípios à prática clínica. **São Paulo: Vp**, 2007. 319 p. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=481633&indexSearch=ID>>. Acesso em: 26 out. 2016.

PELLETIER, C. *et al.* Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. **Applied And Environmental Microbiology**, France, v. 63, n. 5, p.1725-1731, 1997. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168469/pdf/631725.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2016.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p.229-239, 30 out. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n2p229>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

PÉREZ, P. F. *et al.* Surface Properties of *Bifidobacterial* Strains of Human Origin. **Applied Environmental Microbiology**, [s. L.], v. 64, n. 1, p.21-26, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124666/>>. Acesso em: 22 set. 2016.

PINTO, L. P. S. *et al.* O uso de probióticos para o tratamento do quadro de intolerância à lactose. **Revista Ciencia & Inovação**, [s. L.], v. 2, n. 1, p.56-65, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.fam.br/revista/index.php/cienciaeinovacao/article/view/24/31>>. Acesso em: 30 out. 2016.

RAMÍREZ, J. C. R. *et al.* Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, Nayarit, Mexico, v. 2, n. 7, 2011. Disponível em: <<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

RANADHEERA, C. S. *et al.* In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.619-625, dez. 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1959.13/1309183>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **Fems Microbiology Letters**, Ramat Aviv, v. 9, n. 1, p.29-33, set. 1980. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x/abstract>>. Acesso em: 22 set. 2016.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Netherlands, v. 12, n. 2-3, p.163-171, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694601001601>>. Acesso em: 28 out. 2016.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. 1.ed. **São Paulo: Varela**, 2011. 669 p.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p.1-16, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/viewFile/44095/47716>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

SANTOS, T. T. *et al.* Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 73, p.259-266, nov. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816303358>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Melbourne, Austrália, v. 17, n. 11, p.1262-1277, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694607000696>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

SHEHATA, M. G. *et al.* Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals Of Agricultural Sciences**, Alexandria, Egypt, v. 61, n. 1, p.65-75, jun. 2016. Disponível

em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S057017831630001X>>. Acesso em: 01 set. 2016.

SILVEIRA, T. F. V.; VIANNA, C. M. M.; MOSEGUI, G. B. G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p.1189-1202, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-3312009000400015>. Acesso em: 09 ago. 2016.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Viçosa, Minas Gerais, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n2/03.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2015.

SURONO, I S; HOSONO, A. Types and Standards of Identity. In: TAMIME, Adnan. **FERMENTED MILKS**. Ayr: Blackwell Science Ltd, 2006. Cap. 1. p. 470-476. Disponível em: <<https://ttnngmai.files.wordpress.com/2012/06/fermentedmilks.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

TABBERS, M. M. *et al.* Fermented Milk Containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 in Childhood Constipation: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. **Pediatrics**, [s.l.], v. 127, n. 6, p.1392-1399, 23 maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606153>>. Acesso em: 30 out. 2016.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. **Journal Of Dairy Research**, Great Britain, v. 55, n. 02, p.281-307, maio 1988. Disponível em: <<http://sci-hub.bz/10.1017/S002202990002611X>>. Acesso em: 28 out. 2016.

URNAU, D. *et al.* Isolation, identification and characterization for resistance to acid pH and presence of bile salts of probiotic strains from commercial fermented milks. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [s.l.], v. 67, n. 384, p.5-10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/2238-6416.20120002>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p.6-21, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v91n1/0021-7557-jped-91-01-00006.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2016.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, [s.l.], v. 36, n. 9-10, p.895-904, jan. 2003.

Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(03\)00098-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(03)00098-x)>. Acesso em: 14 nov. 2016.

WANG, Y.; HAN, J. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. **Aquaculture**, Hangzhou, v. 269, n. 1-4, p.349-354, set. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.010>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ZÁRATE, G. *et al.* Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. **Journal of food Protection**, San Miguel de Tucumán, v. 63, n. 9, p.1214-1221, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983795>>. Acesso em: 03 nov. 2016.