

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde e a qualidade de vida tornou a alimentação importante tema das pesquisas científicas. Neste contexto merecem destaque os microrganismos probióticos, considerados aliados de quem almeja bem-estar e minimizar os riscos de ocorrência de enfermidades.

A alimentação tem correlação direta com a saúde, fato que justifica a procura dos consumidores por fontes de proteína animal de melhor qualidade e produtos processados que não possuam elevadas quantidades de aditivos químicos. Sendo assim, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em elaborar produtos mais saudáveis e que atendam aos parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e pela legislação.

Deste modo, surgiu o conceito de alimentos funcionais, não só para os seres humanos como para os animais, constituindo produtos alimentícios que exercem funções além da nutrição, sendo capazes de produzir efeitos metabólicos e fisiológicos, garantindo a saúde e o bem estar através da prevenção de algumas doenças.

A indústria de laticínios é a que apresenta maior possibilidade de crescimento no fornecimento de produtos funcionais, em especial no segmento de leites fermentados, por meio da utilização de culturas probióticas, como microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e de substâncias prebióticas.

Bactérias lácticas são tradicionalmente utilizadas na produção de alimentos e de bebidas fermentados, contribuindo para o desenvolvimento de sabor, e com potencial em inibir microrganismos indesejáveis pela capacidade de produzir substâncias inibitórias.

Os iogurtes e leites fermentados têm sido usados como veículo para incorporação de organismos probióticos. A incorporação de probióticos nos leites fermentados não requer grandes investimentos tecnológicos para o desenvolvimento do produto, uma vez que a tecnologia de fabricação não apresenta mudanças significativas. Entretanto para obter-se o efeito benéfico desejável, conforme exigência da legislação, deve conter um número mínimo de bactérias viáveis, geralmente 10^6 ou 10^7 UFC/g de produto (BRASIL, 2007).

As culturas probióticas são suplementos microbianos que aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, além de contribuir para melhorar as características sensoriais do produto final.

A contaminação microbiana de alimentos assume destacada relevância tanto para indústria quanto para Saúde Coletiva, visto que interfere na qualidade final do produto e pela possibilidade de veicular microrganismos patogênicos. Logo, as indústrias utilizam diversos recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de conservantes químicos, conservação pelo frio, entre outros. Cientificamente há relatos de que tais procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos e que os conservantes químicos podem ser perigosos para a saúde; como também a existência de microrganismos tolerantes ao frio representa uma grande preocupação para a indústria.

Uma das estratégias utilizadas pelas indústrias de alimentos é a bioconservação que consiste na exploração da capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir microrganismos considerados indesejáveis.

As bacteriocinas, substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias, apresentam importante valor como aditivos alimentícios ao serem ativas frente a microrganismos deteriorantes e/ou patógenos presentes nos alimentos.

O estudo do efeito de probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande relevância, uma vez que o leite e derivados tem sido relatados como alimentos veiculadores de microrganismos.

Com base nos fatos supracitados, no presente trabalho objetivou-se:

- avaliar *in vitro* a ação antagonista de estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* frente aos microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- avaliar *in vitro* a ação antagonista de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sobre os microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- elaborar leite fermentado com as bactérias lácticas supracitadas e observar a viabilidade destas durante o prazo de estocagem do produto sob refrigeração;
- inocular as cepas patogênicas estudadas nos leites fermentados elaborados e analisar a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas durante a estocagem do produto;
- realizar análises físico químicas para determinação da acidez, teor de proteína e teor de gordura dos leites fermentados elaborados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O interesse dos consumidores em alimentos específicos ou componentes alimentares fisiologicamente ativos, também denominados alimentos funcionais é justificado pela necessidade de melhoria da saúde. Durante a última década, o termo funcional, aplicado aos alimentos, assumiu diferente conotação que é a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além daquele de satisfazer as necessidades nutricionais básicas (HASLER, 1998). A definição legal de alimento funcional foi estipulada em 1991, quando da criação de uma legislação específica, caracterizada pela “Foods for Specified Health Use” (FOSHU), referente a alimentos para uso especial da saúde (SANDERS, 1998).

A denominação “alimentos funcionais” foi inicialmente definida no Japão como alimentos similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte da dieta normal, que apresentam benefícios fisiológicos e reduzem o risco de doenças crônicas, além das funções nutricionais básicas (BRANDÃO, 2002; KOMATSU, et al., 2008; PORTUGAL et al., 2001).

Os alimentos funcionais ingeridos devem exercer no organismo uma função específica, que permita a regulação de algum processo corporal concreto como: aumento dos mecanismos biológicos de defesa, controle das condições físicas e mentais e retardo dos processos de envelhecimento (MENRAD, 2003; SOUZA et al., 2003).

A origem dos alimentos funcionais data de 1930, quando o médico Minora Shirota, ao trabalhar junto aos pobres e mal nutridos, descobriu os benefícios da bactéria *Lactobacillus casei* para a regulação do trânsito intestinal. Shirota fundou a Companhia Yakult Honsha em 1955 e começou a produzir as garrafas de 65 mililitros de leite fermentado que se tornaram progressivamente sucesso mundial (RAUD, 2008).

Com o aumento da expectativa de vida dos brasileiros e ao mesmo tempo o aparecimento de enfermidades crônicas como obesidade, hipertensão, osteoporose, diabetes e câncer, promovendo o aumento da mortalidade em idades cada vez mais precoce, é crescente a preocupação com alimentação saudável para prevenir a ocorrência de doenças. Os consumidores acreditam nos benefícios oferecidos por alimentos e por bebidas, incluindo melhoria no funcionamento cardíaco, manutenção da energia ou o aumento do vigor físico, melhora da saúde digestiva e da função do sistema imunológico; fornecendo níveis mais elevados de saciedade e reduzindo o risco de doenças específicas, entre outros (ABIA, 2005; HASLER, 1998).

Acompanhando o processo de urbanização e modernização, as pessoas mudaram os hábitos, passando a consumir dietas mais calóricas, comidas prontas ou semi-prontas, lanches rápidos preparados com maior quantidade de carboidratos, gorduras saturadas, insaturadas e colesterol, aliados à prática cada vez menor de atividades físicas acarretando alterações do estado nutricional que podem ser causadoras da elevada incidência de doenças crônico degenerativas (BRANDÃO, 2007).

Associado a tal fato, o avanço tecnológico no setor de produtos alimentícios industrializados e o acesso a novos conhecimentos científicos tem promovido mudanças nos conceitos de nutrição. O setor de alimentos vem, ao longo dos últimos anos, despertando a atenção de governos, indústrias, economistas e, principalmente, consumidores, sobre a importância que os alimentos devem representar para a saúde da população. Atualmente, um número significativo de consumidores menciona a preocupação com a saúde; além da procura pelo sabor, preço e conveniência no momento de decisão pela compra de um alimento ou bebida (ABIA, 2005).

O caráter funcional pode ser atribuído à qualidade inerente à matéria prima ou à característica implementada através de tecnologias de processamento inovadoras ou a adição de ingredientes promotores da saúde como os probióticos à matriz alimentar (BISTROM; NORDSTROM, 2002; OLIVEIRA, et al., 2002).

Produtos lácteos fermentados podem ser incluídos na categoria de alimentos funcionais devido ao elevado conteúdo de cálcio, que pode reduzir a osteoporose, hipertensão e câncer de cólon, e outros componentes benéficos à saúde. A funcionalidade de alimentos lácteos também pode ser atribuída a componentes como antioxidantes e microrganismos probióticos (PRADO, 2007).

O termo prebiótico é utilizado para designar ingredientes alimentares não digeríveis e absorvíveis pelo organismo, que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e atividade metabólica de uma ou um número limitado de espécies bacterianas no cólon (FERNANDES, et al., 2008; FRANCO et al, 2006).

Dentre os alimentos prebióticos os mais utilizados são a inulina, lactulose e os frutooligosacarídeos, resistentes à ação das enzimas salivar e intestinal, atingindo o cólon intactos e atuando como substrato específico para as bactérias probióticas (FRANCO et al, 2006; REIS et al, 2007).

Os microrganismos probióticos ao agirem sobre os prebióticos permitem maior ação bioterapêutica ao hospedeiro, sendo esta relação denominada de simbiose (FRANCO et al, 2006). Assim, a ingestão simultânea de prebióticos e probióticos no alimento tornando-o um simbiótico, fornece expectativas maiores de efeitos benéficos quando os mesmos atingirem o intestino, incluindo-os na classificação de alimentos funcionais (REIS et al, 2007).

Entretanto, salienta-se que o alimento funcional possui potencial para promover a saúde, por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, e não a cura de doenças. O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação (KOMATSU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2002).

No Brasil a alegação de propriedade funcional é relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. A legislação sobre alimentos funcionais é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), que possui uma Comissão de Assessoramento Técnico-Científica em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos para avaliar os relatórios técnico científicos exigidos e as alegações de propriedades funcionais. Na Resolução número 18, de 30 de abril de 1999, foi aprovado o regulamento técnico onde constam as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades

funcionais e/ou de saúde alegadas na rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999a). E na Resolução número 19, de 30 de abril de 1999, estão regulamentados os procedimentos para o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e de saúde na rotulagem (BRASIL, 1999b).

2.2 PROBIÓTICO

O termo probiótico, de origem grega, significa “para vida”, sendo inicialmente proposto como descritivo de compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano. Posteriormente, os agentes probióticos foram definidos como microrganismos viáveis, o que inclui bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado, que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido à melhoria das propriedades e o equilíbrio da microbiota indígena (FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006; REIS et al., 2007).

Segundo a legislação, seguindo determinações da Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Diversos autores, ao elaborarem uma definição mais completa, afirmam serem microrganismos isolados da microbiota intestinal do hospedeiro potencial e que devem ser capazes de sobreviver e colonizar o intestino, manter viabilidade e atividade no alimento carreador antes do consumo, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal e produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor (ALVES et al., 2005; MARTINS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002; PINTO et al., 2003).

Todavia, há probióticos com diferentes composições de microrganismos e mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie podem ter diferentes cepas. A eficácia dos produtos é estritamente dependente da quantidade e características das cepas do microrganismo usado na elaboração, além disso, quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas ou liofilizadas, algumas de suas propriedades são perdidas (FRANCO et al., 2006).

Os gêneros mais utilizados como probióticos tanto para animais como para humanos são: *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus* (BARRANTES et al., 2004).

Na lista da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão determinados como probióticos *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*. Foram retirados da listagem os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* por serem espécies necessárias para produção de iogurte e não possuírem efeito probiótico cientificamente comprovado (BRASIL, 2002, BRASIL, 2008b).

As bactérias clássicas utilizadas na elaboração de iogurte não resistem às condições adversas do trato digestório, pois são sensíveis à bile, e são incapazes de colonizar o intestino humano. Ao contrário, as culturas probióticas, fornecem efeitos terapêuticos ao homem ao se fixarem na parede do cólon (ANTUNES et al., 2004).

Entretanto, Haully et al. (2005) ao elaborarem iogurte de soja com suplementação de prebiótico, oligofrutose e inulina, observaram que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* apresentaram resistência ao ácido clorídrico e à bile, além de permanecerem viáveis em quantidades suficientes para caracterizar o iogurte como alimento probiótico.

Os microrganismos probióticos mais empregados, principalmente na indústria de laticínios, são os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; isolados de todas as porções do trato gastrointestinal humano saudável, sendo o íleo terminal e o cólon, respectivamente, o local de preferência para a colonização (BIELECKA et al., 2002; BOYLSTON et al., 2004; KEMPKA et al., 2008). Convém salientar que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (BIELECKA et al., 2002).

Algumas características são necessárias para que uma cultura seja considerada probiótica como: segurança para o uso; adesão à mucosa epitelial do intestino; resistência a ácidos, enzimas pancreáticas e digestivas, tolerância à bile; velocidade específica de crescimento elevada; imunomodulação sem efeito pró inflamatório; diminuição ou eliminação de microrganismos patogênicos do epitélio intestinal;

ausência de patogenicidade e carcinogenicidade; ausência de genes determinantes de resistência; capacidade de colonização e persistência no trato gastrointestinal; capacidade para produção de substâncias que levem ao antagonismo do crescimento de patógenos beneficiando a microbiota intestinal (BRANDÃO, 2007; DANIEL, et al., 2006; HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; OLIVEIRA et al., 2002; SAARELLA et al., 2000).

Na produção de um alimento probiótico é fundamental, também, que o microrganismo possa ser cultivado em escala industrial, apresente estabilidade, resistência a fagos e viabilidade no processo e estocagem. O sucesso da adição de culturas probióticas é dependente das espécies e linhagens usadas, das interações metabólicas com bactérias lácticas, das condições de fermentação, do pH do produto, da presença de oxigênio e da temperatura de estocagem. O produto final deve ter prazo de estocagem satisfatório e propriedades sensoriais como cor, aroma, sabor e textura aceitáveis, além de um número de células viáveis presentes durante toda a validade comercial, maior do que 6 log UFC/ mL ou g (FARIA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002; SAARELLA et al., 2000; ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004).

A quantidade mínima viável para os probióticos, exigida pela legislação do Ministério da Saúde, é situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g de alimento, na recomendação diária do produto pronto para o consumo conforme indicação do fabricante, podendo ser aceito valores menores desde que a empresa comprove a eficácia (BRASIL, 2008b). Gomes e Malcata (1999) afirmaram que a necessidade de manter um número elevado de microrganismos viáveis no produto final é decorrente da dose diária mínima recomendada, e que devem ser consumidos regularmente para manter o nível populacional adequado e o efeito dos microrganismos na composição da microbiota intestinal.

É necessário considerar que as evidências científicas acumuladas até o momento também não são claras quanto à colonização do intestino pelos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* administrados oralmente, o que justifica a necessidade de uma suplementação com microrganismos viáveis contínua na dieta para que os benefícios de longo prazo à saúde possam ocorrer (BARRETO et al., 2006).

O fornecimento de bactérias probióticas para a alteração da microbiota intestinal estabelecida em crianças e indivíduos adultos é um processo complexo visto que estes microrganismos têm se deparado com a estabilidade do ecossistema intestinal.

Uma vez que os nichos ecológicos do trato gastrointestinal estejam ocupados por comunidades bacterianas que se auto regulam, se torna extremamente difícil uma nova bactéria aderir-se e estabelecer-se no sistema. Pesquisadores, que realizam estudos com probióticos, tem demonstrado que apesar da aderência ao trato gastrointestinal, a permanência ocorre apenas enquanto a suplementação é mantida (REDONDO, 2008).

2.2.1 Ação e Benefícios dos Probióticos

A ecologia intestinal exerce função fundamental em beneficiar o hospedeiro, entretanto, apesar do empenho de pesquisadores em esclarecer as propriedades nutritivas e terapêuticas de alimentos funcionais incorporando bactérias probióticas, alguns resultados são altamente variáveis e por vezes inconsistentes (GOMES; MALCATA, 2000).

Três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos são relatados na literatura, sendo o primeiro relacionado à supressão do número de células bacterianas viáveis mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (OLIVEIRA et al., 2002). Determinados autores ressaltam ainda a modificação do pH do meio intestinal, o aumento da secreção da mucosa, a inativação das toxinas e dos receptores (MADSEN, 2001; MATSUMOTO et al., 2005).

O principal objetivo da utilização dos probióticos é aumentar o número e a atividade dos microrganismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro (FULLER, 1989). De modo geral, o espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006).

São necessárias 40 bactérias patogênicas para recobrir a superfície de uma célula intestinal, possuindo fímbrias que são estruturas de aderência, compostas por fosfoglicoproteínas, que se projetam por todo corpo bacteriano e apresentam receptores específicos que diferem entre espécies e os diferentes locais ao longo do trato intestinal (FRANCO et al., 2006).

A capacidade de ocupação física dos sítios intestinais e colonização por bactérias probióticas, especialmente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp, bloqueia os sítios de ligação ou receptores celulares na mucosa entérica, reduzindo a área de interação e formando uma barreira para as bactérias patogênicas; que são excluídas por competição (FRANCO et al., 2006; JATOBÁ et al., 2008; ROSTAGNO et al., 2003). A exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente; justifica a necessidade da administração continuada e a elevadas doses dos probióticos para manifestar os efeitos desejados (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004).

Além da ocupação dos sítios, a microbiota intestinal e os probióticos produzem e liberam substâncias antibacterianas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, podendo também secretar algumas enzimas, com ação frente aos patógenos (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006).

As bactérias ácido lácticas produzem nisina, diplococcinas, lactocidina, bulgaricina e reutina, substâncias que inibem patógenos Gram positivos e Gram negativos. Em estudos foi revelado que bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Lactobacillus* tiveram ação inibitória sobre *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp., corroborando que as diferentes espécies de *Lactobacillus* são fundamentais na composição dos probióticos. Com base nos processos de assimilação de alimentos, os ingredientes não absorvidos integralmente pelo hospedeiro, denominados prebióticos, são metabolizados pelos probióticos que sintetizam alguns ácidos orgânicos (propiónico, acético, butírico e láctico) e peróxido de hidrogênio, que agem inibindo o crescimento de patógenos Gram negativos (FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006).

As bactérias dos alimentos probióticos se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas normais ou que foram intencionalmente adicionados à dieta como prebiótico. Metabolizam rapidamente carboidratos, vitaminas, aminoácidos; ocorrendo competição por nutrientes, tornando-os indisponíveis constituindo fator limitante para o desenvolvimento das bactérias patogênicas (FRANCO et al., 2006).

Em referência aos efeitos nutricionais e fisiológicos são relatados na literatura a ocorrência do aumento da digestibilidade das proteínas e gorduras; a absorção

acrescida de cálcio e ferro; o equilíbrio do conteúdo em várias vitaminas, principalmente K e as do grupo B; a presença de alguns metabólitos secundários; a redução da produção de amoníaco e auxílio na eliminação de amins biogênicas tóxicas; a proteção às vilosidades e às superfícies absortivas contra toxinas irritantes produzidas por patógenos, permitindo regeneração da mucosa intestinal lesada e restauração da microbiota na antibioticoterapia (FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006).

As bactérias lácticas e as bactérias bífidas são as principais bactérias saprófitas comprometidas pelo uso de antimicrobianos. Quando, por algum modo, a microbiota intestinal foi desbalanceada por tratamentos com antimicrobianos, quimioterapia, radioterapia ou por situações de estresse, os tratamentos adotados podem causar reações diversas. Uma das reações pode ser a diarreia, que elimina os microrganismos benéficos, importantes para o equilíbrio da microbiota intestinal. Por isso, as bactérias lácticas em conjunto com as bactérias bífidas agem no organismo de maneira benéfica e completa (BISCAIA et al., 2004).

Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-galactosidade (galactosidase), auxiliando a quebra da lactose no intestino. Essa ação, associada à fermentação da lactose pelas bactérias e a menor velocidade de esvaziamento gástrico proporcionada pelos leites fermentados, é fundamental particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, os quais são incapazes de digerir-la adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal em grau variável (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2002).

Diversos autores, realizando estudos com bactérias ácido lácticas, demonstraram que os probióticos tem efeito imunoestimulante em animais e no ser humano, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos referentes ao estímulo. O efeito pode estar relacionado à capacidade dos microrganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células produtoras de IgA e a migração de células T do intestino. Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; FERNANDES et al.; 2008).

Nas criações de animais, como por exemplo aquicultura e avicultura, os probióticos são alternativa para reduzir a utilização de antimicrobianos no controle de

enfermidades bacterianas, evitando a indesejável seleção de estirpes resistentes. Os probióticos podem melhorar a saúde do animal agindo na prevenção de doenças, diminuindo a carga microbiana por exclusão competitiva ou produção de substâncias inibidoras; e podem estimular o sistema imunológico dos animais (JATOBÁ et al., 2008).

Pesquisadores têm evidenciado a influência do consumo de Bactérias Ácido Láticas (BAL) e produtos fermentados de leite sobre a atividade enzimática, principalmente da β glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase, da microbiota intestinal associada com a carcinogênese do cólon por converterem procarcinógenos em carcinógenos ou formarem aminas nocivas ao organismo (SAARELA et al., 2000). Alguns probióticos, como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., possuem a capacidade de reduzir os níveis de enzimas bacterianas fecais que ativam compostos pró carcinogênicos (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004; FERNANDES et al., 2008; FERREIRA, 2003). O mecanismo de inibição pode também estar associado a alterações das condições fisiológicas do cólon; ligação e ou degradação de carcinógenos potenciais; alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal; alterações das condições físico-químicas do cólon, como redução do pH; efeitos na fisiologia do hospedeiro, ocasionados pela ação da microbiota probiótica (BEDANI, 2008).

Também em estudos, ainda controversos, foi descrito o efeito hipocolesterolêmico dos probióticos, segundo mecanismos que envolvem a produção de inibidores da síntese de colesterol (propionato), utilização do colesterol por assimilação e precipitação através das enzimas sintetizadas pelas bactérias lácticas que desconjugam ou desidroxilam os sais biliares. Os sais biliares desconjugados são menos solúveis em pH baixo e precipitam, induzindo uma co-precipitação do colesterol, desta forma são eliminados nas fezes, e assim mais colesterol é requerido para síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo o nível de colesterol sanguíneo, principalmente o colesterol "low density lipoprotein" (LDL) (FERNANDES et al., 2008; FERREIRA, 2003; MACHADO et al., 2003).

Dentre as substâncias com atividade biológica benéfica produzidas por alguns probióticos, destaca-se a produção do ácido linoléico conjugado (CLA) que possui ação anticarcinogênica e antioxidante, capacidade de diminuir a quantidade de lipoproteína de baixa densidade evitando as lesões arteroscleróticas e de alterar a

composição corpórea reduzindo a gordura e aumentando a massa muscular (MIYOSHI et al., 2009).

Entre os benefícios atribuídos aos probióticos, os que possuem fundamento científico são: diminuição da incidência, duração e gravidade de doenças gástricas e intestinais com ingestão diária de 10^{10} a 10^{11} de bactérias lácticas; preservação da integridade intestinal e atenuação dos efeitos de outras doenças intestinais como a diarreia infantil induzida por rotavírus, a diarreia associada ao uso de antibioticoterapia, a doença intestinal inflamatória e a colite; redução da gravidade da hepatopatia alcoólica experimental; inibição da colonização gástrica com *Helicobacter pylori* que é associado a gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico; enfermidades cardiovasculares; osteoporose e diabetes mellitus não insulino dependente (FRANCO et al., 2006; SANTOS; SÁ, 2007).

Não se pode afirmar que todas as linhagens de probióticos produzem os mesmos efeitos desejáveis à saúde. Além do mais, as bactérias probióticas somente apresentam efeitos biológicos no trato intestinal se atingirem uma concentração recomendada aproximada de 10^7 a 10^8 UFC/mL de produto e se estiverem viáveis no momento da compra. A viabilidade depende de fatores como o pH, a presença de microrganismos competitivos, a temperatura de armazenagem e a presença de inibidores bacterianos no alimento como o cloreto de sódio e o peróxido de hidrogênio (FRANCO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002).

Os probióticos normalmente tem pouco tempo de vida e ação, devendo ser mantidos sob refrigeração. Ao serem ingeridos através dos alimentos, vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, sem se fixarem, equilibrando-a e auxiliando o trabalho de absorção dos nutrientes (BRANDÃO, 2007).

2.2.2 Aspectos Tecnológicos dos Probióticos

Existe a necessidade de seleção cuidadosa das estirpes a serem utilizadas pelas indústrias alimentares e o monitoramento constante ao longo de todo processo de manufatura, de forma a assegurar um controle mais eficaz dos produtos de fermentação, em termos do pH final (FERNANDES et al., 2008).

As estirpes probióticas podem ser adicionadas como cultura única, ou em conjunto com outras bactérias lácticas, durante a fermentação, ao produto final já fermentado ou ainda ao produto fresco antes da distribuição (GOMES; MALCATA, 2000).

Deve-se considerar que a sobrevivência e a viabilidade celular das bactérias probióticas são dependentes da espécie e da tecnologia de produção, sendo comum a utilização de duas bactérias para a fermentação do substrato; uma bactéria suporte e outra probiótica. A bactéria suporte tem a função de conferir corpo ao produto pela síntese de exopolissacarídeos, reduzir o pH e promover o crescimento das probióticas. Porém há relatos que comprovam que produtos elaborados somente com bactérias probióticas apresentam maior estabilidade microbiológica (NEVES, 2005).

É importante o conhecimento e o controle na associação do uso das culturas. *Bifidobacterium* spp. combinado com culturas de *L. acidophilus* ou com culturas de outras bactérias lácticas, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus e *Streptococcus thermophilus*, oferecem algumas vantagens como melhores taxas de crescimento, redução do tempo de fermentação, ausência de certos defeitos sensoriais e aumento do valor nutritivo dos produtos finais (GOMES; MALCATA, 2000; OLIVEIRA et al., 2002; ROBINSON; TAMINE, 1990).

O estudo da influência das condições da cultura sobre as cinéticas de crescimento e acidificação permite a obtenção de informações interessantes a respeito da fisiologia das estirpes bacterianas utilizadas industrialmente. Dentre estas condições, a temperatura, o pH e as concentrações em substrato e em produtos, são as que exercem maior influência sobre a fase de crescimento exponencial das bactérias lácticas. As características do inóculo, a atividade de água (Aa), a osmolaridade, as concentrações de oxigênio e de substâncias inibitórias do meio também são fatores importantes (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

As propriedades físico-químicas dos alimentos tem influenciado a sobrevivência de estirpes probióticas durante o trânsito intestinal, sendo a capacidade tamponante e o pH do meio carreador fatores relevantes. Formulações de alimentos com pH entre 3,5 e 4,5 como iogurtes, queijos e leites fermentados tem alta capacidade tamponante e podem aumentar o pH do trato gástrico e, assim, melhorar a estabilidade da estirpe probiótica. Os probióticos devem ser veiculados em produtos selecionados que sejam de fácil aceitação pelo consumidor, nos quais o microrganismo seja conservado na

forma viável. Neste contexto, o leite e derivados oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético (BADARÓ et al., 2009).

Os leites fermentados podem apresentar proporção maior de aminoácidos livres devido a atividade proteolítica das culturas lácticas, que hidrolisa parcialmente as proteínas durante a fermentação. Os teores de vitaminas mais altos no produto final podem ser observados porque algumas culturas tem a capacidade de sintetizar vitamina B e ácido fólico durante a fermentação (BUTTRISS, 1997; GOMES; MALCATA, 1999).

Segundo Oliveira e Damim (2003) as bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido à falta de atividade proteolítica, sendo a prática mais comum a adição de bactérias do iogurte para melhorar o processo de fermentação para a fabricação de leites fermentados contendo probióticos. Entretanto, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produz ácido láctico durante o armazenamento sob refrigeração. Este fenômeno conhecido por pós acidificação, afeta a viabilidade das bactérias probióticas, podendo ser evitado com o uso de culturas iniciadoras isentas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SILVA, 2007; VICTAL; KNIGHT, 2009; ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004).

Outra possibilidade de melhorar a capacidade dos alimentos veicularem os probióticos é adicionar fontes energéticas, como por exemplo glicose, fatores de crescimento, como extrato de levedura e proteína hidrolisada, ou certos tipos de antioxidantes, minerais e vitaminas (NEVES, 2005).

As características sensoriais são de extrema importância na aceitação do produto pelo consumidor. Compostos como acetaldeído, diacetil, etanol, acetona e 2-butanona conferem aroma e sabor a diversos produtos lácteos. Dentre estes, o acetaldeído é considerado o composto mais proeminente para o aroma típico do iogurte. A estabilidade do aroma é maior quando são empregadas co-culturas contendo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Entretanto, produtos lácteos contendo *L. acidophilus* são caracterizados como deficientes em sabor e aroma porque o microrganismo sintetiza a enzima álcool desidrogenase que converte acetaldeído em etanol (OLIVEIRA et al., 2002; ROBINSON; TAMINE, 1990). Segundo Robinson e Tamine (1990) a desvantagem no sabor e aroma pode ser solucionada com a adição de proteínas do soro lácteo e treonina ao leite. Os autores relataram que nessas condições, a treonina em excesso é clivada em acetaldeído via glicina, porém não há

aumento na quantidade da enzima álcool desidrogenase permanecendo o acetaldeído adicional.

Na indústria de alimentos os exopolissacarídeos de origem microbiana são amplamente empregados como agentes espessantes, geleificantes e estabilizantes. Na fabricação de leites fermentados os exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas são muito utilizados devido às propriedades reológicas que proporcionam aos produtos (PRADO, 2007).

Outra característica explorada pelas indústrias alimentícias é a capacidade dos microrganismos probióticos inibirem os indesejáveis, quer sejam deteriorantes ou prejudiciais à saúde. O processo denominado bioconservação tem crescente aplicação na indústria alimentícia, sendo as bactérias lácticas os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores; devido às características antagônicas ao crescimento bacteriano por meio de diversos mecanismos como competição por oxigênio, por sítios de ligação e produção de substâncias antimicrobianas, especialmente bacteriocinas. Também alguns ácidos, principalmente ácido lático e acético, tem sido utilizados como conservantes de alimentos, juntamente com a queda do pH, inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos (DE MARTINIS et al., 2003; PEREIRA; GOMÉZ, 2007).

As bacteriocinas podem ser utilizadas como barreiras bactericidas e ajudar a reduzir a susceptibilidade de alimentos à multiplicação de microrganismos patogênicos; sendo consideradas uma tecnologia biológica (DE MARTINIS et al., 2002).

A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos e reconhecida como aditivo alimentar pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 UI/Kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. A aplicação de bacteriocinas em alimentos tende a ser mais eficiente quando as estirpes produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las (DE MARTINIS et al., 2003).

2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

As bactérias ácido lácticas possuem interesse industrial e grande importância econômica, sejam encontradas na forma natural ou adicionadas intencionalmente aos alimentos, por serem fundamentais no processamento de fermentados. A adição direta de culturas selecionadas tem representado um avanço na elaboração de produtos fermentados, resultando em alto grau de controle sobre o processo fermentativo e de padronização do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004).

Segundo Oliveira et al. (2002), o emprego de bactérias lácticas em alimentos é de longa data e a maioria das estirpes empregadas é considerada como microrganismo comensal, ou seja, sem potencial patogênico. Entretanto, Jay (2005) relata a existência de doenças humanas envolvendo *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. e *Enterococcus* spp., associados a infecções nasocomiais por serem consideradas microrganismos oportunistas.

Dentre os microrganismos utilizados, as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais frequentemente consideradas seguras, "status" referido como "Generally Recognized As Safe" (GRAS) (OLIVEIRA et al., 2002).

As atividades metabólicas da microbiota GRAS contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis no produto, como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima. Além de proporcionarem sabor, textura e incrementarem o valor nutricional dos alimentos podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por competição direta por nutrientes e pela produção de compostos antagônicos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ALEXANDRE et al., 2002; CHESCA et al., 2009; FONTES et al., 2005; GUERRA; BERNADO, 2005; MARTINEZ et al. 2003; MARTINIS et al., 2003).

Todos os membros do grupo apresentam a mesma característica de produzir ácido láctico a partir de hexoses. Por serem microrganismos fermentadores, não possuem sistemas hemeligados funcionais de transportes de elétrons ou de citocromos, obtendo energia a partir da fosforilação de substratos durante a oxidação de carboidratos; não realizando o ciclo de Krebs. São classificadas em homofermentativas e heterofermentativas de acordo com os produtos finais formados do metabolismo dos carboidratos presentes nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos, fundamentalmente ácido láctico, e conseqüentemente reduzir pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas; constituindo uma importante característica que favorece ao desenvolvimento de probióticos a partir desse grupo bacteriano (ALEXANDRE et al., 2002; JATOBÁ et al., 2008).

Segundo Jay (2005), o grupo das bactérias ácido lácticas é composto por doze gêneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella*.

Pertencem ao grupo de bactérias Gram positivas, bastonetes curvos e curtos, às vezes na forma de cocos ou bacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, são estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém, aerotolerantes, e geralmente catalase negativas (KANDLER; WEISS, 1986).

Quanto às necessidades para o crescimento destaca-se o requerimento de aminoácidos, vitaminas B, bases púricas e pirimídicas. Embora mesofílicas, algumas podem crescer sob temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. Com relação ao pH, algumas se desenvolvem abaixo de 3,2, outras acima de 9,6, mas a maioria na faixa de pH entre 4,0 e 4,5. São consideradas pouco proteolíticas e lipolíticas (JAY, 2005).

O gênero *Lactobacillus* é o maior do grupo das bactérias lácticas, descrito inicialmente em 1901 por Beijerinck, é composto por mais de 60 espécies, as quais apresentam grande variedade de características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas. Encontra-se amplamente difundido na natureza; apresenta espécies homolácticas e heterolácticas, sendo a maioria termodúrica. São utilizados na indústria de alimentos como culturas iniciadoras em leites fermentados, queijos, soro de leite, entre outros (CHIODA et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

Espécies do gênero *Lactobacillus* são células longas e finas, apresentam-se na forma de bacilos ou cocobacilos, isolados ou em cadeias, requerem nutrientes complexos, são anaeróbicos ou microaerófilos e acidofílicos, com pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2. Entretanto, o desenvolvimento geralmente ocorre em pH menor ou igual a 5,0; em pH neutro ou levemente alcalino a taxa de crescimento é reduzida. Multiplicam-se em largo espectro de temperatura, de 2 a 53 °C; sendo geralmente a temperatura ótima de crescimento de 30-40°C. São encontrados nos mais diversos

habitats, tais como mucosas de humanos e animais (cavidade oral, intestino e vagina), em plantas ou material de origem vegetal, nas fezes e em substratos manipulados por humanos, como esgoto e alimentos fermentados. Raramente apresentam patogenicidade (KANDLER; WEISS, 1986). O crescimento é afetado por vários fatores ambientais, como: pH, tensão de oxigênio, nível de substrato disponível, presença de secreções e interações com outros microrganismos (BRANDÃO, 2007).

Quanto ao metabolismo fermentativo são obrigatoriamente sacarolíticos, tendo o lactato como no mínimo metade de seu produto final sob o carbono. Outros produtos adicionais podem ser acetato, etanol, dióxido de carbono, formato ou succinato. Raramente reduzem o nitrato, não liquefazem gelatina, sendo catalase e citocromo negativos (KANDLER; WEISS, 1986).

O *Lactobacillus delbrueckii* é homofermentativo e apresenta três subespécies: *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermenta apenas os seguintes carboidratos: frutose, glicose, lactose, manose e sorbitol (ibid.). É um microrganismo oriundo do leite que compete com os lactobacilos probióticos no processo de fermentação e, durante o armazenamento sob refrigeração, produz peróxido de hidrogênio e ácido láctico, que também afetam a sobrevivência de bactérias probióticas. Outro inconveniente é a pós-acidificação do produto. Entretanto, quando a cultura “starter” está ausente de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, o tempo de fermentação é de duas a três vezes maior, uma vez que a ação proteolítica dessa bactéria estimula a acidificação por *S. thermophilus* (LUCAS et al., 2004; OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

Em 1990, Moro foi o primeiro a isolar espécies alongadas anaeróbicas facultativas de fezes de recém-nascidos, a qual denominou *Bacillus acidophilus*, como sendo um nome genérico para *Lactobacillus intestinalis* (BRANDÃO, 2007). É um microrganismo comensal do trato gastrointestinal humano, sendo resistente ao ácido gástrico o que permite persistir por mais tempo no estômago do que outras bactérias (BATHIA et al., 1989).

Lactobacillus acidophilus são bacilos em forma de bastão com as extremidades arredondadas, geralmente medindo de 0,6-0,9 X 1,5-6,0 µm (micrômetros), crescendo isolado, em pares ou formando curtas cadeias; tendo como temperatura ótima de crescimento, com raras exceções, 45°C (ibid.). É considerado um homofermentador

obrigatório e um microrganismo microaerófilo, sendo que o desenvolvimento é geralmente favorecido pela anaerobiose (VIEGAS, 2008).

Tem sido utilizado pela indústria de laticínios como probiótico na elaboração de vários produtos, os quais podem apresentar inúmeras aplicações na nutrição humana como suplementos alimentares, suspensões orais, comprimidos, iogurtes e leites fermentados (CHIODA et al., 2007).

As bactérias do gênero *Streptococcus* são Gram positivas, células esféricas ou ovóides, medindo de 0,5-2,0 μm de diâmetro, ocorrendo aos pares ou em cadeias quando em meio de crescimento líquido. Não apresentam motilidade e não formam esporos. São anaeróbias facultativas, requerem meio para crescimento rico em nutrientes e podem necessitar de 5% de dióxido de carbono. São catalase negativo e possuem metabolismo fermentativo, produzindo predominantemente ácido láctico, porém sem produção de gás. Pequenas quantidades de ácidos acético e fórmico, etanol e dióxido de carbono também podem ser produzidas. Todas as espécies fermentam a glicose, resultando principalmente em ácido láctico. A utilização de outros carboidratos é útil para a identificação entre as espécies. A faixa de temperatura de crescimento é 25-45°C, sendo a ótima 37°C. Muitas são comensais ou parasitas em seres humanos ou animais, principalmente da cavidade oral e trato respiratório. Algumas espécies são patogênicas e uma pequena quantidade é saprófita e ocorre no meio ambiente (HARDIE, 1986; HARDIE; WHILEY, 1997).

O *Streptococcus thermophilus* é utilizado com predominância em associação com outras culturas “starter” na elaboração de queijos e iogurtes (TAMINE, 1990).

2.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

A fermentação é um método de preservação utilizado desde os primórdios da civilização, devido à ausência de métodos de refrigeração ou pasteurização (FARIA et al., 2006). É definida como processo no qual transformações químicas são realizadas em substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por microrganismos. Sob o aspecto bioquímico, é o processo metabólico no qual carboidratos e compostos relacionados são parcialmente oxidados, resultando em liberação de energia, sem qualquer aceptor de elétrons externo. Os aceptores finais de elétrons são compostos orgânicos produzidos diretamente da quebra de

carboidratos. Consequentemente ocorre oxidação incompleta do composto original, resultando em liberação de pequena quantidade de energia e reduzidos compostos orgânicos (JAY, 2005).

Um típico exemplo de conservação de alimentos por fermentação ácido láctica é a elaboração de produtos lácteos fermentados como queijos, iogurtes, leite acidófilo e manteiga; e por fermentação ácido láctica e alcóolica o kefir e o kumiss. Os processos de fermentação constituem no resultado da presença de bactérias, bolores e leveduras, isolados ou em associação, e das enzimas sintetizadas pelos microrganismos no leite (TAMINE, 1990).

A preservação é conferida principalmente pela formação de ácido láctico proporcionando a redução do pH normal do leite, 6,6, para tipicamente valores menores que 4,0, em processamento de iogurtes, e menores que 4,6 em leites fermentados. Esse processo é mediado por culturas especiais denominadas lácticas ou “starter”, contendo variedade de espécies de BAL, basicamente de dois tipos: termofílicas, com temperatura ótima de crescimento em torno de 45°C, e mesofílicas em torno de 30°C (COGAN; ACCOLAS, 1990).

A fermentação envolve a coagulação das proteínas do leite por microrganismos que acidificam o meio, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria prima. Entretanto, a fermentação natural é de difícil controle, uma vez que, o tipo e a quantidade de microrganismos no leite variam, podendo ocasionar efeitos indesejáveis e comprometer a qualidade do produto final. Para o controle do processo, empregam-se culturas de microrganismos simples ou mistas que uma vez adicionadas ao leite sob condições específicas irão promover as modificações desejáveis esperadas (FERREIRA, 2001; TAMINE, 1990).

Os cultivos iniciadores ou “starters” podem ser definidos como preparação microbiana de grande número de células de pelo menos um microrganismo, com o objetivo de ser acrescentado à matéria-prima e produzir um alimento fermentado, acelerando e controlando o processo de fermentação (LEROY; DE VUYST, 2004). O desenvolvimento e a otimização de um cultivo “starter” podem ser aperfeiçoados através da engenharia genética. A técnica pode ser utilizada para a introdução de genes, codificados com determinadas propriedades que estão presentes em outros microrganismos, como por exemplo, em um determinado cultivo iniciador competitivo (SANTO, 2003).

Tamine (1990) citou como exemplos de culturas “starter” utilizadas pela indústria de laticínios os gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Convém ressaltar que cuidados básicos devem ser adotados na seleção e no manuseio das culturas “starter” comerciais, visto que podem ter o crescimento e a produção de ácido inibidos pela presença de componentes inibidores naturais do leite, resíduos de antimicrobianos resultantes da adoção de terapias no animal, resíduos de detergentes e desinfetantes utilizados na limpeza de equipamentos, contagem de células somáticas elevada e bacteriófagos (COGAN; ACCOLAS, 1990; TAMINE, 1990).

A fermentação ácido láctica constitui uma reação derivada da energia na qual as bactérias ácido lácticas atuam como catalisadoras biológicas no processo de transformação de carboidratos em ácidos orgânicos e compostos protéicos. As bactérias lácticas são caracterizadas pela produção de diferentes isômeros do ácido láctico mediante a fermentação da glicose; podendo produzir ácido láctico L(+) dextrorrotatório ou L(-) levorotatório ou a mistura de ambos DL (CARR et al., 2002).

A homofermentação é a principal rota de catabolismo da glicose, conhecida como glicólise ou via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), onde um mol de glicose ou qualquer substrato glucosídico é degradado a dois moles de ácido láctico, sem presença de oxigênio molecular (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005; WILLET, 1989). É constituída por duas fases, sendo que na primeira a glicose é fosforilada por moléculas de ATP e clivada para formar gliceraldeído fosfato. Na segunda fase, o gliceraldeído fosfato é convertido a ácido láctico numa série de reações de óxido-redução, que estão acopladas por meio de moléculas de NADH e NAD à fosforização do ADP para permitir a continuidade dos ciclos de fermentação subsequentes. O piruvato formado durante a reação é reduzido a ácido láctico pela ação da enzima lactato-desidrogenase (WILLET, 1989).

Esta via de fermentação é realizada por todos os membros dos gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus* e muitas espécies de *Lactobacillus* (CARR et al., 2002). Por sua vez, a heterofermentação ocorre pela via das pentoses-fosfato ou via de Dickens, é efetuada por alguns gêneros de bactérias lácticas como *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus*. Caracteriza-se pela fermentação da glicose via pentose-fosfato a ácido láctico numa porcentagem de 50% e o restante originando dióxido de carbono (CO₂), álcool, ácido acético, fórmico, entre outros, paralelamente com duas moléculas de ATP e NADH₂NAD para permitir a continuação do processo

de fermentação. A liberação do carbono um (C1) como dióxido de carbono é característica dos organismos heterofermentativos (HAMMES; VOGEL, 1995; WILLET, 1989). As bactérias heteroláticas são mais importantes na produção de componentes de aroma e sabor tais como diacetil e acetaldeído (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

Durante a fermentação as bactérias do iogurte, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, crescem em simbiose, ou seja, estimulam-se mutuamente, complementando o crescimento uma da outra. Produzem ácido láctico a partir da lactose e compostos aromáticos, além de formar coágulo, sendo a temperatura ideal para o desenvolvimento da cultura láctica 42°C. Diversos estudos tem sido realizados para estabelecer a melhor proporção entre cocos e bastonetes na cultura mista a ser empregada, a tendência é a relação 1:1 (LACERDA et al. , 2007; RODAS et al., 2001). No início da fermentação, o pH do leite em torno de 6,5 favorece o desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus*, iniciando a produção de ácido no meio devido à conversão da lactose. Com o aumento da acidificação ocorre o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que são proteolíticos, obtêm aminoácidos a partir da degradação da caseína (glicina, histidina, valina) e ativam o crescimento do *Streptococcus* spp. que, por sua vez, estimula o crescimento dos lactobacilos, com a produção de ácido fórmico e gás carbônico. Procura-se manter o equilíbrio adequado das bactérias, para que o produto permaneça suficientemente ácido e aromático (REIS et al., 2007; RODAS et al., 2001; TAMINE; DEETH, 1980; VEISSEYRE, 1988).

Os microrganismos utilizados em fermentação de alimentos provocam modificações benéficas, geralmente melhorando o sabor, o aroma e a textura; e muitas vezes, acumulando vitaminas, co-fatores, além de ácidos orgânicos. Atuam parcialmente sobre um ou mais dos componentes básicos dos alimentos como hidratos de carbono, proteínas e lipídios, melhorando a digestibilidade. Entretanto, por deficiência no metabolismo, são incapazes de oxidar totalmente os componentes, originando metabólitos que contribuem para formação de sabor e das características reológicas do substrato, além de terem efeito de conservação (FERREIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

As propriedades profiláticas e terapêuticas dos produtos fermentados estão relacionadas, principalmente, à antibiose proporcionada pelos ácidos orgânicos

produzidos na fermentação, ao potencial de oxido-redução, as bacteriocinas e as substâncias antimicrobianas (CHANDAN; SHAHANI, 1993).

2.5 PRODUTOS DO METABOLISMO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Os produtos do metabolismo das BAL contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis no produto final e para a conservação pela formação de compostos antagônicos (ALEXANDRE et al., 2002; CHESCA et al., 2009; FONTES et al., 2005; GUERRA; BERNADO, 2005; MARTINEZ et al. 2003; MARTINIS et al., 2003).

As atividades metabólicas das BAL tem importância comercial pela produção de ácido láctico a partir da lactose, pela conferência de sabor e aroma pelo diacetil, acetato, CO₂ e acetaldeído, e pela formação de aminoácidos e peptídeos resultante da hidrólise das proteínas. Os compostos diacetil, acetato e CO₂ são originados da fermentação do citrato, enquanto o acetaldeído do metabolismo da treonina e demais açúcares (COGAN; ACCOLAS, 1990).

Um dos principais produtos do metabolismo é o ácido láctico, resultante do processo de fermentação, que além de ser responsável pela estabilidade do produto fermentado, contribui para o desenvolvimento do sabor, aroma e textura. Também possui propriedades como otimizar a digestibilidade das proteínas precipitando-as em finas partículas, estimular a secreção e estabelecer o pH do suco gástrico acelerando o esvaziamento do estômago, melhorar a absorção de cálcio, fósforo e ferro (FERREIRA, 2001; PIARD et al., 1997).

O mecanismo de inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis está baseado na dissociação dos ácidos orgânicos no meio, provocando um gradiente de prótons que excede a capacidade tamponante do citoplasma desequilibrando a bomba de prótons, ocasionando como consequência a desnaturação dos componentes estruturais ou o esgotamento das reservas energéticas da célula interferindo com a viabilidade (TORO, 2005).

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação das oxidases ou NADH peroxidases constitui um mecanismo de proteção frente ao oxigênio, sendo o acúmulo desta molécula nos produtos fermentados justificado pelo fato que os lactobacilos não possuem a enzima catalase (DAESCHEL, 1989; TORO, 2005). A ação bactericida do

H₂O₂ é atribuída à capacidade oxidante, proporcionando a peroxidação dos lipídeos da membrana e a destruição da estrutura básica molecular das proteínas celulares (DAHL et al., 1989).

Bactérias lácticas com capacidade para realizar fermentação butanodiólica e de fermentar o citrato produzem diacetil (2-3 butanodieno) responsável pelo aroma e que em elevadas concentrações também possui efeito antimicrobiano (DAESCHEL, 1989; LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990; TORO, 2005).

A fermentação de açúcares com produção de CO₂, por bactérias lácticas heterofermentativas, contribui para a inibição de microrganismos através de dois fatores: a respiração dos tecidos (alimentos) que pelas condições anaeróbicas formadas inibe microrganismos aeróbios obrigatórios e o aumento da pressão parcial do dióxido de carbono, inibindo de forma parcial, determinado tipo de microrganismo. A sensibilidade ao CO₂ não é comum a todos os microrganismos. Mofos e bactérias Gram negativas são mais suscetíveis, enquanto que, lactobacilos e algumas leveduras possuem alta tolerância. O mecanismo de inibição é complexo e envolve uma combinação de efeitos, como a redução do pH intracelular, a inibição de reações enzimáticas e a interação com a membrana celular impedindo o transporte de solutos. A inibição de microrganismos por CO₂ pode ser comprovada atualmente com a utilização em escala comercial de embalagens para produtos alimentícios utilizando atmosfera modificada (SANTO, 2003).

Determinadas bactérias lácticas são capazes de sintetizar compostos protéicos denominados de bacteriocinas com atividade letal contra outras bactérias. Estes compostos geralmente atuam na despolarização da membrana celular alvo ou pela inibição da síntese da parede celular (PRADO, 2007).

2.5.1 Bacteriocinas

A produção de bacteriocina tem despertado grande interesse no campo prático, sendo amplamente utilizada no controle de patógenos de alimentos, atuando como agentes terapêuticos em infecções bacterianas de difícil controle e no controle biológico de bactérias fitopatogênicas (JACK et al., 1995; LEWUS et al., 1991).

São peptídeos ou proteínas com atividade antibacteriana, com elevado peso molecular, sintetizadas em nível de ribossomas celulares, e, portanto, podem ser

inativadas por algumas enzimas proteolíticas. Possuem pequeno espectro de ação centrado nas espécies relacionadas, ligando-se a receptores celulares específicos, sendo a célula hospedeira considerada imune. Os determinantes genéticos que codificam a produção, geralmente, são de natureza plasmidial podendo ser transferidos por conjugação, transformação ou transdução (JACK et al., 1995; TAGG et al., 1976).

As bacteriocinas de bactérias lácticas apresentam propriedades bioquímicas comuns como sensibilidade à ação das enzimas proteolíticas, por exemplo as de origem pancreática e gástrica, tolerância a pH ácidos ou neutro e termo resistência relacionada a estrutura molecular normalmente composta por peptídeos pequenos (PIARD; DESMAZEAUD, 1992).

As primeiras bacteriocinas foram caracterizadas em *E. coli*, sendo denominadas colicinas, e são as mais estudadas. A partir da década de 90, começaram também a ser estudadas em bactérias Gram-positivas como, por exemplo, as produtoras de ácido láctico devido à grande importância econômica na indústria alimentícia (JACK et al., 1995).

Quatro classes diferentes de bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas foram definidas. Os lantibióticos são peptídeos pequenos pertencentes a classe I, menores que 5000 Da (19 a 38 aminoácidos), que contêm aminoácidos atípicos na estrutura, modificados pós tradução, tais como lantionina, metillantionina, lacticina; sendo o principal representante a nisina. Os pequenos, menores que 10000 Da, pertencem a classe II; são termoestáveis, hidrofóbicos, com modificações na cadeia de aminoácidos e atuam sobre a membrana celular. As bacteriocinas mais comuns produzidas pelas bactérias lácticas, pertencem a esta classe. Alguns exemplos destas bacteriocinas são Lactococin A, Lactacin F, Pediocin PA-1 e Pediocin AcH. A classe III é referente às proteínas termolábeis de peso molecular superior a 30000 Da como a Helveticina J, Helveticina V-1829, Acidofilucina A e Lactacinas A e B. E a classe IV é constituída por bacteriocinas que formam grandes complexos com uma mistura indefinida de proteínas, lipídios e carboidratos que são requeridos para sua atividade, sendo exemplos a Plantaricina S, Leuconocina S, Lactocina 27 e Pediocina SJ1 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; CLEVELAND et al., 2001; REDONDO, 2008; SANTO, 2003).

Cleveland et al. (2001), enfatizaram que, além da aplicação das bactérias lácticas como probióticos, as bacteriocinas também são utilizadas na conservação de alimentos, sendo a nisina a única produzida comercialmente. Legalizada em 1988 nos Estados Unidos quanto à segurança como GRAS pelo “Food and Drug Administration” (FDA), tem o uso aprovado em alimentos em mais de 50 países; sendo empregada em larga escala na indústria de alimentos como agente antimicrobiano em queijos, ovo líquido, molhos e alimentos enlatados. É permitida no Brasil em queijos com limite de 12,5mg/kg de produto final.

De acordo com Cleveland et al. (2001) e Nascimento et al. (2008) a nisina é classificada como um lantibiótico, por conter o aminoácido lantionina, com capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Clostridium botulinum* (CLEVELAND et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008). Entretanto, foi demonstrado em pesquisas que a ingestão de nisina não interfere sobre a microbiota gastrintestinal, uma vez que o peptídeo antimicrobiano é susceptível a proteólise por tripsina e quimiotripsina (SCHULZ et al., 2003).

Mello et al. (2006) demonstraram a eficiência da ação da nisina utilizada em embalagens ativas em inibir o crescimento de *Staphylococcus* spp. durante o período de armazenamento. Nascimento et al. (2008) observaram que a ação antimicrobiana da nisina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* depende da espécie e cepa do microrganismo alvo, sendo que 100% das cepas de *L. monocytogenes* e *S. aureus* avaliadas apresentaram sensibilidade à bacteriocina, enquanto apenas 40% das cepas de *B. cereus* foram sensíveis.

Apesar do espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas ser limitado às bactérias Gram positivas, é relatado na literatura a inibição de espécies Gram negativas tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Vibrio cholerae* (BEDANI, 2008). O fato é justificado pelo uso de agentes quelantes como Ácido Etilenodiamino Tetra Acético (EDTA), ácidos graxos ou a aplicação de estresse subletal, como calor ou congelamento, ocasionando o rompimento da camada de lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias Gram negativas, aumentando a sensibilidade em relação às bacteriocinas (BROMBERG et al., 2006).

O mecanismo de ação é característico para cada tipo de bacteriocina, entretanto, o principal é a alteração da permeabilidade celular ou inibição da síntese do DNA, RNA e outras macromoléculas. Uma característica importante é a capacidade do microrganismo produtor de bacteriocina sobreviver à ação da sua própria bacteriocina através do mecanismo de imunidade específica, que consiste na produção de uma proteína imune (CLEVELAND et al., 2001; JACK et al., 1995; TAGG et al., 1976). Os genes responsáveis pela produção e imunidade de muitas bacteriocinas estão agrupados e organizados em um ou até dois operons e geralmente o gene que codifica a imunidade específica está muito próximo do gene de produção (CLEVELAND et al., 2001; KOLTER; MORENO, 1992).

Segundo Klaenhammer (1993) existem dois mecanismos principais de imunidade com base na ação de bacteriocinas: o fator de imunidade pode interagir com o receptor da bacteriocina ou as bacteriocinas podem ser importadas e inativadas pela célula.

Antes de serem liberadas, as bacteriocinas são acumuladas no citoplasma onde serão transportadas na forma solúvel. Contudo, o transporte das bacteriocinas depende da expressão de um gene que codifica a proteína de liberação de bacteriocina denominada de proteína de lise. Geralmente, o operon da bacteriocina codifica três proteínas: a bacteriocina, a proteína de imunidade e a proteína de lise. A proteína de imunidade tem a função de proteger a célula da ação letal da sua própria bacteriocina e a proteína de lise de auxiliar na liberação da bacteriocina (CLEVELAND et al., 2001; JACK et al., 1995).

Existem diversas técnicas para se detectar a produção de bacteriocina, a maioria baseada na inibição do crescimento de um microrganismo indicador (sensível) por uma cepa teste (produtora). As cepas com atividade antagonística potencial devem ser submetidas a testes confirmatórios da atividade inibitória com a finalidade de se excluir a possibilidade da inibição ter sido devido à produção de ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio ou à presença de bacteriófagos líticos (DE MARTINIS et al., 2002). Grande parte dos testes está baseada na difusão de bacteriocinas em meio de cultura sólido e semi-sólido a fim de se inibir o crescimento de um microrganismo sensível, como ocorre nos métodos de difusão em poços, “flip-streak” e “spot on the lawn” (LEWUS; MONTVILLE, 1991).

2.6 LEITE FERMENTADO

A origem dos leites fermentados é baseada no histórico do hábito das comunidades nômades em preservar o leite estocado em recipientes de peles de animais e potes de barro, possibilitando o desenvolvimento da fermentação e consequente aumento da viscosidade (ROBINSON; TAMINE, 1990).

Em 1907, o pesquisador Metchnikoff, do Instituto Pasteur de Paris, foi o primeiro a relatar a influência dos leites fermentados na saúde humana, quando observou a longevidade dos camponeses búlgaros, atribuindo o fato à dieta básica de leite fermentado. Após isolar o *Lactobacillus bulgaricus* de amostras de leite, associou ao microrganismo a capacidade de melhorar o ecossistema intestinal, fortalecer a saúde e aumentar a expectativa de vida do ingestor. Tal afirmativa foi posteriormente corroborada por outros pesquisadores que fizeram referência à implantação do *Lactobacillus acidophilus* no trato intestinal. A partir das descobertas, várias culturas lácticas foram isoladas e caracterizadas, bem como o processo de fermentação passou a ser controlado e padronizado pelas indústrias (LODDI, 2001; VIEGAS, 2008).

Os leites fermentados são definidos como produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade. O leite utilizado na fabricação de leites fermentados poderá ser em natureza ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea. Os tipos de leites fermentados regulamentados são: iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, “kefir”, “kumys” e coalhada (BRASIL, 2007).

Segundo Robinson e Tamine (1990) as variedades de leite fermentado são classificadas de acordo com o método de fermentação por microrganismos específicos e com o processamento tecnológico.

A utilização dos probióticos nos produtos lácteos fermentados data do surgimento da civilização e são mencionados na Bíblia e nos livros sagrados do Hinduísmo. Provavelmente o ambiente e as condições climáticas favoráveis tiveram influência no desenvolvimento de muitos produtos fermentados tradicionais, que eram utilizados

terapeuticamente antes do reconhecimento dos microrganismos, pela importância dos alimentos contendo probióticos na promoção da saúde humana (SHORTT, 1999).

Devido à propagação lenta das bactérias probióticas em leite, que se reflete na falta de competitividade quando em presença de outros microrganismos, recomenda-se a produção das estirpes selecionadas em larga escala sob condições processuais de padrões de higiene; sendo conveniente a utilização de culturas liofilizadas ou ultracongeladas para inoculação direta, com capacidades de concentração até 10^{10} a 10^{11} UFC/g no fabrico de laticínios à escala comercial, de modo a permitir uma maior flexibilidade no controle das qualidades sensorial e microbiológica, garantindo o efeito benéfico do produto (FARIA et al., 2006; REIS et al., 2007).

Também é aconselhável a adoção de tratamento térmico rigoroso e controle da acidez final do produto, que deve ter prazo comercial satisfatório, variando de um a trinta dias com características sensoriais agradáveis e os microrganismos permanecendo viáveis e em número elevado (FARIA et al., 2006).

Segundo Gomes e Malcata (2000) é inviável, do ponto de vista econômico e comercial, a fermentação utilizando apenas microrganismos probióticos; sendo indicado o emprego de microrganismos da cultura tradicional de iogurte em combinação para reduzir o tempo de fermentação, melhorar a taxa de crescimento, melhorar o sabor e a textura do produto final e aumentar o valor nutritivo. Uma das alternativas adotadas pela indústria é o uso de culturas de *Bifidobacterium* spp. combinadas com culturas de *L. acidophilus* ou de outras bactérias lácticas, por exemplo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (GOMES; MALCATA, 2000; SILVA, 2007).

Entretanto, é importante salientar que diversos fatores podem prejudicar a multiplicação das bactérias probióticas durante a elaboração desses produtos, bem como a sobrevivência desses microrganismos durante o período de armazenamento; entre eles a composição do meio de fermentação e a quantidade de oxigênio dissolvido. Assim, a adição de hidrolisados protéicos de caseína ou de soro, extrato de levedura, glicose, vitaminas e minerais, sempre em proporções compatíveis com a legislação, pode estimular a multiplicação e a sobrevivência das culturas probióticas e desenvolver a textura dos produtos. A adição de proteínas resulta, também, no aumento da capacidade tamponante do leite fermentado e pode retardar a queda de pH e impedir modificações desse parâmetro durante o armazenamento do produto,

permitindo, assim, maior sobrevivência das cepas probióticas (KOMATSU et al., 2008).

O crescimento e a viabilidade de bactérias benéficas no leite fermentado também podem ser aumentados pela incorporação de dióxido de carbono (200-800mg/Kg), soro em pó no caso de bebidas lácteas fermentadas, frutooligossacarídeos e outros prebióticos (PEREZ, et al., 2007; REIS et al., 2007). A ingestão de prebióticos e probióticos em um só alimento tornando-o um simbiótico, fornece expectativas maiores de efeitos benéficos quando os mesmos atingirem o intestino (REIS et al., 2007).

O regulamento técnico de identidade e qualidade do leite fermentado determina como ingredientes obrigatórios no produto: leite e/ou leite reconstituído padronizado no conteúdo de gordura, cultivos de bactérias lácticas e/ou cultivos de bactérias lácticas específicas. Como ingredientes opcionais é permitido o uso de: leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou "butter oil", leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, frutas em forma de pedaços, polpas, sucos e outros preparados à base de frutas, maltodextrinas; e outras substâncias alimentícias (mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café e outras) isoladas ou combinadas, açúcares e/ou glicídios (exceto polialcoóis e polissacarídeos); cultivos de bactérias lácticas subsidiárias; amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto final. Os ingredientes opcionais não lácteos, sós ou combinados deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final (BRASIL, 2007).

As características sensoriais do produto com relação ao aspecto devem ser fluído, pastoso ou geleificado; de coloração branca ou de acordo com as substâncias permitidas adicionadas; odor e sabor acidulado e de acordo com as substâncias adicionadas (ibid.).

Referente aos requisitos físico químicos, no que diz respeito à acidez é preconizado para o iogurte 0,6 a 1,5 g ácido láctico/100g; leite cultivado ou fermentado 0,6 a 2,0 g ácido láctico/100g, leite acidófilo 0,6 a 2,0 g ácido láctico/100g; "Kefir" 0,5 a 1,5 g ácido láctico/100g; "Kumys" maior que 0,7 g ácido láctico/100g e coalhada 0,5 a 1,5 g ácido láctico/100g (BRASIL, 2007).

2.7 IOGURTE

Iogurte é definido na legislação como o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado, ou não, de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante a ação protosimbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, aos quais pode se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido lácticas que, pela atividade metabólica, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2008 a; BRASIL, 2007).

O leite empregado no processamento do iogurte deve ser de boa procedência e qualidade, pois é responsável pelo valor nutricional, tendo que ser submetido a tratamento térmico (pasteurização ou tratamento UAT – Ultra Alta Temperatura), a fim de eliminar microrganismos patogênicos e destruir as substâncias inibidoras do crescimento bacteriano presentes no leite cru como as aglutininas (VEISSEYRE, 1988).

O tratamento térmico do leite para fabricação de iogurte deve ser mais severo do que o utilizado na pasteurização convencional. O aquecimento térmico de 85°C por 30 minutos ou 95° por 5 a 10 minutos proporciona a eliminação de todos os microrganismos patogênicos não-esporulados; a redução da carga microbiana competitiva; a redução da quantidade de oxigênio do leite, facilitando o crescimento das culturas lácticas microaerófilas; a quebra dos constituintes do leite, especialmente proteínas, liberando peptonas e grupos sulfidrilas favorecendo as condições de crescimento das culturas “starter”; desnaturação e coagulação das albuminas e globulinas do leite o que aumenta a viscosidade e a estabilidade do gel do produto (CHANDAN; SHAHANI, 1993; ORDOÑEZ, 2005; ROBINSON; TAMINE, 1990).

O pH e a temperatura ótimos para o desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus* são 6,8 e 38°C respectivamente, enquanto que o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* estão compreendidos em 6,0 e 43°C. O primeiro microrganismo cresce elevando a acidez até 90°D, por sua vez o lactobacilo chega a 140°D. Entretanto, a cultura “starter” do iogurte deve conter uma porcentagem igual dos dois microrganismos, do

contrário não se obterá a consistência e a característica sensorial desejável no produto industrializado (BEHMER, 1999).

Segundo Tamine e Deeth (1980) a relação simbiótica ótima entre cocos e bacilos para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto é dependente das propriedades das estirpes utilizadas, sendo aconselhável 1:1, pois a predominância de qualquer uma das espécies por fatores como temperatura, tempo de incubação e porcentagem do inóculo, pode acarretar em defeitos para o produto final.

Durante o processo de produção do iogurte, que normalmente ocorre em média 4 a 5 horas de incubação em temperaturas de 40 a 44 °C, o leite líquido tem a consistência alterada, em virtude da coagulação das proteínas. A redução de pH a 5,1- 5,2, resultante da produção de ácido láctico durante a fermentação, causa a desestabilização das micelas de caseína e a coagulação completa ocorre em pH de 4,6, correspondente ao ponto isoelétrico da proteína. Quando o pH desejado é atingido, o leite coagulado é resfriado rapidamente, para que a fermentação seja praticamente interrompida (VAN DE WATER, 2003).

O pH de um iogurte pode alcançar valores de 3,8 a 4,0, e apesar de não haver um padrão específico para o pH do iogurte na legislação, a técnica de fabricação típica consiste na obtenção de um produto com pH final entre 4,2 e 4,5 (ORDOÑEZ, 2005). As culturas tradicionais utilizadas na fermentação do iogurte não pertencem à microbiota intestinal, por isso não sobrevivem por um longo tempo no trato intestinal em concentrações compatíveis para exercerem efeitos probióticos *in vivo*. A característica torna duvidoso o caráter probiótico dos microrganismos do iogurte, uma vez que melhoram a digestão de lactose e eliminam sintomas de intolerância ao dissacarídeo (VAN DE WATER, 2003).

Diversos autores consideram que o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e o *Streptococcus thermophilus* atuem apenas como culturas bioajustadoras de pH, geralmente empregadas na fabricação de produtos lácteos fermentados junto a microrganismos probióticos, para atingirem uma acidez segura no período aceitável; em contrapartida outros propõem que as preparações frescas do iogurte podem ser consideradas produtos probióticos porque conferem benefícios comprovados a saúde do hospedeiro. Em recente estudo envolvendo 13 indivíduos comprovou-se que a ingestão de iogurte fresco durante duas a três semanas proporcionou contagens de bactérias lácticas superiores a 10^4 ufc/g nas fezes dos indivíduos, o que sugere que

as bactérias do iogurte, quando em alta concentração, vencem a acidez do trato gastrointestinal e colonizam o intestino humano, promovendo efeitos probióticos no hospedeiro (BRANDÃO, 2007).

Vinderola e Reinheimer (2003) relatam que tanto no caso das culturas probióticas quanto das culturas “starter”, as características probióticas e a resistência às barreiras biológicas são variáveis para diferentes espécies e mesmo para diferentes cepas de uma mesma espécie.

Tal fato reafirma a necessidade da adição de outras culturas de bactérias com o intuito de melhorar o valor nutricional do produto em questão. As bactérias mais comumente utilizadas para a suplementação do iogurte são *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, que podem ser isoladas do próprio trato intestinal do ser humano e dos animais (REIS et al., 2007; SILVA, 2007).

O iogurte, um dos mais antigos alimentos funcionais consumidos pelos humanos, apresenta algumas propriedades nutricionais de alto valor, como conter baixo teor de lactose, proteólise pela ação das bactérias lácticas e melhora da digestão, variedade de vitaminas e minerais, incluindo elevada biodisponibilidade do cálcio (VARAVALLO et al., 2008).

Quanto ao teor de gordura o iogurte pode ser classificado como: com creme (mínimo de 6% de gordura); integral (mínimo de 3% de gordura); parcialmente desnatado (máximo de 2,9% de gordura) e desnatado (máximo de 0,5% de gordura) (BRASIL, 2007).

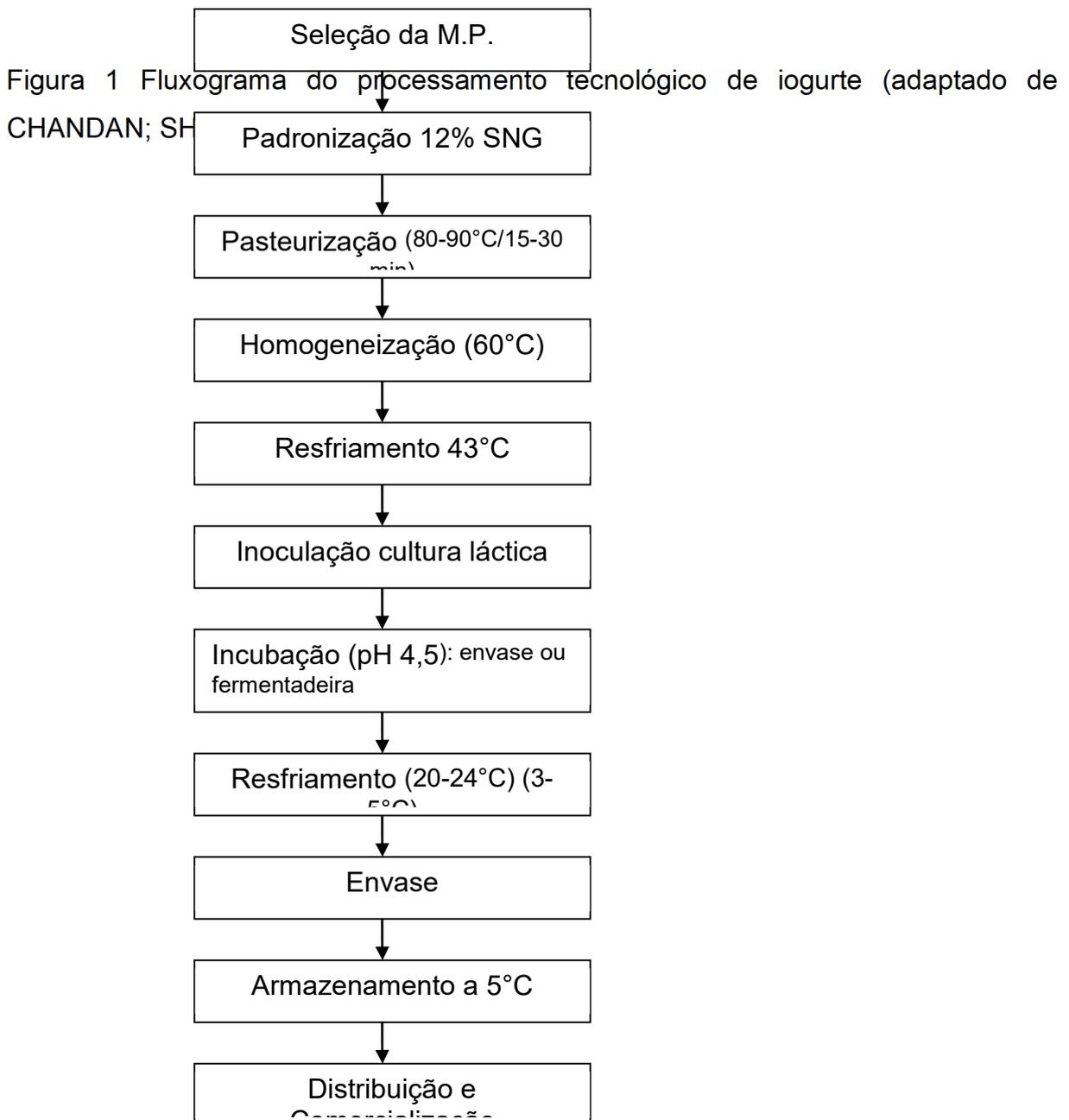
Dependendo da natureza físico-química do coágulo o iogurte pode ser dividido em tradicional (textura firme), batido (textura cremosa, resultante da quebra da massa após o resfriamento) ou líquido (quebra da massa antes do resfriamento). Quanto ao sabor e aroma, pode ser natural (sem adição de flavorizantes), com frutas ou aromatizado com flavorizantes (ORDOÑEZ, 2005).

Sendo o iogurte um produto biológico e de grande valor dietético, o emprego de conservantes ou inibidores químicos de fermentação deve ser excluído da elaboração, pois podem eliminar totalmente o valor terapêutico e torná-lo um produto de difícil digestão (BEHMER, 1999).

Parâmetros para avaliação do prazo comercial de bebidas fermentadas foram estudados por diversos autores que sugeriram duas a quatro semanas armazenadas a 5°C. Ressaltam ainda, que para ampliar a validade comercial e a manutenção dos

parâmetros físico-químicos e microbiológicos do produto, além da conservação nunca superior a 5°C, é essencial um número mínimo de microrganismos de 10⁸ UFC/g de produto (SOAVE; LACERDA, 2007).

As principais fases do processamento tecnológico do iogurte estão representadas no fluxograma seguinte (Figura 1); no qual, os diferentes métodos de produção basicamente se restringem ao tipo de incubação adotado.



2.8 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS VEICULADOS POR ALIMENTO

Há grande preocupação das autoridades sanitárias pela inocuidade dos alimentos comercializados em todo o país. A segurança alimentar tem sido alvo de muitas pesquisas científicas devido a probabilidade de grande parte dos alimentos comercializados se encontrar fora dos padrões higiênicos sanitários estabelecidos por lei, para garantir a saúde pública (LIMA et al., 2009).

De acordo com as estatísticas apresentadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) as enfermidades transmitidas por alimentos são mais frequentes do que o relatado, e os principais patógenos incriminados são *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (BARRANTES et al., 2004).

Em estudos realizados, demonstraram-se que a *Escherichia coli* O157:H7 ocupa o segundo lugar entre as bactérias enteropatogênicas responsáveis por casos de diarreia não específica, e é o microrganismo mais frequente em diarreia sanguinolenta. Por outro lado, *Listeria monocytogenes* é considerado o agente bacteriano transmitido por alimentos associado a enfermidades com 20-30% de letalidade (ibid.).

Apesar de todas as inovações técnicas, o iogurte pode estar sujeito à contaminação microbiana, quando não atendidas as condições elementares de higiene e sanidade. Tal contaminação pode estar representada principalmente por leveduras, psicrótróficos, coliformes, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e bolores (BRAZAL GARCIA et al., 1986; HOFFMANN et al., 1997).

A fim de garantir produtos em condições sanitárias satisfatórias e a segurança do consumidor, são estabelecidos em legislação padrões microbiológicos aos alimentos destinados ao consumo humano. Com relação a leites fermentados é preconizado o máximo de 10NMP de Coliformes a 45°C/g de alimento (BRASIL, 2001).

A capacidade de multiplicação e sobrevivência de microrganismos patogênicos ou deteriorantes em alimentos é determinada por fatores intrínsecos (pH, sal, atividade de água, potencial de oxi-redução, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período de armazenamento, temperatura ambiental, atmosfera de embalagens) que interagem e atuam como barreiras para o desenvolvimento microbiano. O conhecimento e a utilização adequada e simultânea desses fatores em alimentos constituem os fundamentos da teoria da tecnologia dos obstáculos (“hurdle technology”), que objetiva a obtenção de produtos alimentícios estáveis, de

prolongado prazo comercial e seguros à saúde do consumidor (DE MARTINIS et al., 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

2.8.1 *Listeria monocytogenes*

As bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes Gram positivos curtos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos; podem ocorrer isoladamente em cadeias curtas ou arranjados em ângulos formando “V” entre si ou em grupos que se mantêm paralelos ao longo dos eixos (SEELIGER; JONES, 1986).

Apresentam movimento característico denominado tombamento ou turbilhonamento devido a flagelos peritríquios, que auxilia na identificação. A principal característica é a habilidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração e resistir a sucessivos congelamentos e descongelamentos. A faixa de temperatura para multiplicar-se é de 2,5 - 44°C (FRANCO; LANDGRAF, 2005; GERMANO; GERMANO, 2001).

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (ibid.). *Listeria monocytogenes*, agente causador da listeriose, foi reconhecida como patógeno animal em 1924, em Cambridge, por Murray e é inquestionavelmente patogênica para o homem, sendo considerada microrganismo de distribuição ubiqüitária, encontrando-se disseminado na natureza e em diversos tipos de alimentos *in natura* ou processados (GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005; LOGUERCIO et al., 2001; MENG et al., 2001).

O primeiro grande surto envolvendo o microrganismo, que despertou o interesse de microbiologistas, ocorreu no Canadá em 1981 e o alimento incriminado foi salada de repolho industrializada. Depois desse episódio, em 1988 a Organização Mundial de Saúde (OMS) finalmente reconheceu que o consumo de alimentos contaminados é a rota primária de transmissão da *L. monocytogenes* em humanos (DELBONI, 2009).

A listeriose é uma zoonose de relevância em saúde coletiva devido à gravidade da manifestação clínica que pode ocorrer de duas formas: invasiva e não invasiva (gastrointestinal). A listeriose invasiva é a mais severa, pois a taxa de mortalidade é alta (20-30%), principalmente para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido (GAHAN; HILL, 2005; LOGUERCIO et al., 2001; MCLAUCHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004). A listeriose

não-invasiva pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, mas normalmente não evolui para óbito (GAHAN; HILL, 2005; MCLAUCHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004).

Os sintomas iniciais da forma não invasiva são febre, fadiga, mal-estar, náusea, cólicas, vômitos e diarreia; enquanto que a invasiva caracteriza-se pela ocorrência de meningite, encefalite e septicemia (DONELLY, 2001; WALLS; BUCHANAN, 2005).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, contudo a dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida; havendo relatos de 10^3 - 10^9 UFC/g, apesar de surtos com contaminação muito baixa (BORGES et al, 2009).

Os mecanismos pelos quais *L. monocytogenes* causa a listeriose ainda não estão bem definidos, porém é um patógeno intracelular com habilidade de penetrar, multiplicar-se no interior do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

L. monocytogenes tem sido isolada de diferentes alimentos como leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, produtos cárneos crus e termoprocessados, produtos de origem vegetal e refeições preparadas (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A ocorrência em leite e produtos lácteos é relatada em muitos estudos, sendo os queijos, principalmente os de alta e média umidade, os mais comumente contaminados por essa bactéria (BORGES et al., 2009; GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005).

Importantes surtos ocorridos nos Estados Unidos, os alimentos incriminados foram o leite pasteurizado e queijo. No surto causado pelo leite pasteurizado 49 indivíduos foram acometidos, ocorrendo índice de mortalidade de 29% (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Na indústria de laticínios, as principais vias de introdução do patógeno são o leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, o ar, o sistema de ventilação, a água e o manipulador. Vale ressaltar que algumas estirpes podem permanecer no ambiente de processamento durante meses ou anos, representando focos de contaminação do produto após a pasteurização do leite (BORGES et al., 2009).

2.8.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é pertencente à família *Micrococcaceae*, coco Gram positivo, são células esféricas medindo de 0,5-1,0µm de diâmetro, anaeróbio facultativo e algumas estirpes produzem enterotoxina, proteína altamente termo estável, responsável pelos quadros de estafiloenterotoxiose. Multiplica-se entre 7-48°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento; entretanto, a toxina é produzida entre 10-46°C, sendo a faixa de 40-45°C considerada a ótima para a produção (KLOOS; SCHILEIFER, 1986). A faixa de pH para crescimento varia entre 4,0-9,8, sendo o pH ótimo próximo de 6,0 a 7,0; entretanto a produção da enterotoxina está associada a pH entre 5,0-8,0. São tolerantes a concentrações de 10-20% NaCl, desenvolvendo-se em ambientes com atividade de água de 0,83-0,99 (FRANCO; LANDGRAF, 2005; HAJDENWURCEL, 2004).

Os humanos e os animais são os principais reservatórios de *Staphylococcus aureus*, habitantes usuais da pele, mucosas e trato respiratório superior; por isso a importância do controle dos portadores assintomáticos na produção de alimentos (HAJDENWURCEL, 2004).

Entre as espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positiva, *S. aureus* está mais relacionado com casos e surtos de intoxicação alimentar pela habilidade de produzirem exotoxinas superantigênicas (PTSAg), como as enterotoxinas que estimulam a proliferação não-específica de células T (DINGES et al., 2000).

Causador de intoxicação provocada pela ingestão de alimentos com a toxina pré-formada, o período de incubação é de uma a oito horas (duas a quatro horas em média) e os sintomas comuns são náusea, cefaléia, dores abdominais, vômitos e diarreia. Geralmente são necessárias concentrações mínimas de 10^5 - 10^6 UFC/g de alimento e condições adequadas de temperatura, pH, atividade de água e oxigênio para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação. Já foram descritos 18 tipos de enterotoxinas distintas, entretanto a quantidade para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende da susceptibilidade do indivíduo, do peso corporal e estado de saúde da pessoa acometida (BORGES et al., 2008; HAJDENWURCEL, 2004).

Os alimentos comumente implicados em surtos de intoxicação estafilocócica são carnes cozidas, aves, queijos, leite, tortas cremosas e ovos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; GERMANO; GERMANO, 2001; HAJDENWURCEL, 2004).

Estrada et al. (1999) relataram que produtos lácteos contaminados com *S. aureus* constituem sério problema de saúde pública em alguns países subdesenvolvidos e desenvolvidos, fato associado às precárias condições higiênicas na obtenção do leite, à inadequada conservação do leite e ao consumo de lácteos elaborados com leite não pasteurizado.

Segundo Borges et al. (2008) no Japão, entre 1987 e 1996, ocorreram 32 casos de doenças de origem alimentar atribuídos a *S. aureus*, em escolas e berçários escolares, afetando 2.846 crianças; e em julho de 2000 houve outro surto de intoxicação pelo consumo de iogurte contaminado com enterotoxina A, envolvendo 13.420 notificações.

Hoffmann et al. (1997) ao analisarem 18 amostras de iogurtes obtidas de supermercados em uma região de São Paulo, detectaram que 33,3% apresentaram resultados variando de $1,0 \times 10^1$ a $5,0 \times 10^1$ UFC/mL para contagem de *Staphylococcus aureus*.

É descrito na literatura que a presença de microbiota competitiva importante inibe o crescimento do microrganismo assim como favorece a degradação das enterotoxinas, como por exemplo, cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

As medidas preventivas da transmissão do patógeno através do alimento são basicamente práticas adequadas de higiene e sanificação, controle da mamite no rebanho leiteiro, tratamento térmico adequado e refrigeração dos alimentos (HAJDENWURCEL, 2004).

2.8.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. O significado da presença em alimentos deve ser avaliado por indicar contaminação microbiana de origem fecal, portanto condições higiênicas insatisfatórias, e eventual presença de enteropatógenos. Outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens são comprovadamente patogênicas para o homem e animais, dentre essas a *E. coli* O157, implicada como agente etiológico da colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Membro da família *Enterobacteriaceae*, dentre as principais características destacam-se: bacilos Gram negativos, não esporulados, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido e gás, e a maioria também fermenta a lactose (MENG et al., 2001). Considerado mesófilo típico por ser capaz de se desenvolver entre 7-46°C, sendo 37°C a temperatura ótima, embora existam algumas cepas que possam se multiplicar e resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração (FRANCO; LANDGRAF, 2005; GERMANO; GERMANO, 2001).

Apresenta antígenos somáticos O, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com as proteínas de flagelos; e antígenos K correspondentes aos polissacarídeos capsulares. Essas três variedades de antígenos determinam os grupos e tipos sorológicos da espécie. O antígeno O identifica o sorogrupo da estirpe e a combinação do antígeno O e H identifica o sorotipo (MENG et al., 2001).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as estirpes de *E. coli* consideradas patogênicas são divididas em classes: *E. coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* Difusivamente Aderente (DAEC) e *E. coli* Enteroagregativa (EAaggEC) (FRANCO; LANDGRAF, 2005; GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005).

No caso particular da *E. coli* O157:H7, a de maior risco para o ser humano, capaz de produzir citotoxinas, responsável pela forma enterohemorrágica da infecção, são observadas condições peculiares favoráveis ao desenvolvimento, inclusive a sobrevivência por longos períodos em alimentos fermentados ou ácidos (GERMANO; GERMANO, 2001).

A *E. coli* patogênica e não patogênica desenvolvem resposta ao “stress” quando submetidas a condições ambientais desfavoráveis, porém sabe-se que EIEC, EPEC e EHEC são significativamente mais ácido tolerantes que as cepas não patogênicas; e *E. coli* O157:H7 é considerado um dos sorotipos mais ácido resistentes (CHUNG et al., 2006).

As principais vias de transmissão são os alimentos de origem animal e vegetal, principalmente quando consumidos crus ou insuficientemente cozidos. O gado é o reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal, destacando-se a carne bovina, são considerados os principais veículos de

transmissão do patógeno. A carne bovina moída, especialmente o hambúrguer, é a maior responsável pela ocorrência de surtos de *E. coli*; sendo a causa mais comum das infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas (GERMANO; GERMANO, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os produtos lácteos, principalmente o leite cru e os queijos, são vias de transmissão importantes para o patógeno. A pasteurização é eficiente para a eliminação do microrganismo, porém uma contaminação pós-pasteurização pode comprometer a qualidade bacteriológica do alimento produzido, tornando-o impróprio para o consumo humano devido aos riscos de desenvolver doenças de origem alimentar. A água contaminada com despejos de esgoto é uma das mais importantes vias de transmissão do agente na natureza, desta forma, qualquer alimento exposto à contaminação fecal, seja através da água de preparo ou dos manipuladores infectados, é capaz de veicular *E. coli* (GERMANO; GERMANO, 2001).

Apesar dos alimentos fermentados serem considerados produtos com bom nível de segurança, existem relatos de surtos alimentares na literatura, como os ocorridos nos Estados Unidos e na Austrália ocasionados por *E. coli* O157:H7 envolvendo salame e lingüiça fermentados (GETTY et al., 2000).

No Reino Unido, o produto incriminado no surto, que acometeu principalmente crianças que desenvolveram a síndrome urêmica hemolítica por infecção por *E. coli* O157:H7, foi o iogurte de fabricação local. Ao se avaliar o processo de produção do iogurte, foram detectados pontos de contaminação cruzada; higienização e limpeza precárias dos funcionários, instalações, equipamentos e utensílios (MORGAN et al., 1993).

Hoffmann et al. (1997) analisaram 18 amostras de diferentes tipos de iogurte obtidas em supermercados em São José do rio Preto-SP e observaram a ausência de coliformes totais e termotolerantes (*Escherichia coli*) nas amostras avaliadas.

Lima et al. (2009) ao avaliarem a qualidade microbiológica de bebidas lácteas fermentadas comercializadas no Recife, demonstraram que das 18 amostras avaliadas para coliformes totais e termotolerantes apenas duas apresentaram contaminação. Justificaram o resultado encontrado possivelmente pela ação do baixo pH do produto ocasionando estresse bacteriano, não permitindo a detecção dos microrganismos nas análises; ou pelas boas condições higiênico-sanitárias durante o processo de elaboração das bebidas.

Outros alimentos envolvidos em surtos de infecção alimentar são rosbife, salsichas, salame, saladas, espinafre, suco e sidra de maçã, leite cru, iogurte, maionese e broto de alfafa (GETTY et al., 2000; MORGAN et al., 1993).

2.9 AÇÃO ANTAGONISTA DAS BAL

Os mecanismos das relações antagônicas que se estabelecem entre microrganismos colonizadores nos alimentos tem importante significado tecnológico e em Saúde Pública, evitando, muitas vezes, os perigos decorrentes da presença de microrganismos patogênicos (GUERRA; BERNARDO, 2005).

Apesar da cultura mista utilizada na elaboração do iogurte não ser considerada como probiótico, por não resistir a bile e conseqüentemente não sobreviver na passagem pelo trato gastrointestinal, possui efeitos positivos como ação inibidora contra microrganismos patogênicos (SILVA, 2007).

Estudos a respeito da atividade inibitória de estirpes probióticas tem sido realizados e comprovados por diversos pesquisadores. Bathia et al. (1989) estudaram *in vitro* o efeito inibitório do *Lactobacillus acidophilus* e seus metabólitos sobre o crescimento de *Campylobacter pylori*. Tantillo et al. (2002) observaram, pelo método do antagonismo, que cepas de *Lactobacillus sakei* foram capazes de inibir o crescimento de *Listeria innocua*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por sua vez, Alexandre et al. (2002) avaliando a capacidade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo minas frescal, relataram a ação destas frente ao *Lactobacillus sakei*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. *typhimurium*. Entretanto, nenhuma das cepas isoladas foi capaz de inibir o microrganismo *Escherichia coli*.

Chioda et al. (2006; 2007) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de cinco cepas de *Lactobacillus acidophilus* sobre *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e observaram atividade antagonista de todas as cepas através da formação de halo de inibição em meio de cultura específico. Buriti e Saad (2007) verificaram que *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* contribuíram para a bioconservação de queijos frescos cremosos probióticos e simbióticos, tendo sido efetivos na inibição de contaminantes, incluindo coliformes totais, *Staphylococcus*

spp. e *Staphylococcus* DNase positivos, o que não foi observado para os queijos que não continham *Lactobacillus paracasei*. Pereira e Gómez (2007) determinaram que cepa de *Lactobacillus acidophilus* produziu uma substância extracelular e difusível, que apresentou ação inibidora sobre as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Poppi et al. (2008) analisaram o efeito de inibição das células de *Lactobacillus* spp. sobre *Listeria monocytogenes* e observaram que ocorria devido principalmente à presença de ácidos orgânicos, mas também pela produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. De modo similar, Moreno et al. (1999) demonstraram que as bacteriocinas produzidas por *L. lactis* subsp. *lactis* apresentaram ação bactericida, provocando a lise de células de *Listeria innocua*.

Barrantes et al. (2004) elaboraram iogurte somente com cultura “starter” tradicional e outro com adição de cultura probiótica, e observaram que no iogurte com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 ocorreu em um período mais curto do que quando os microrganismos patogênicos foram inoculados em iogurte apenas com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Calderón et al. (2007) também relataram efeito similar em iogurte elaborado com probióticos inibindo o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*. Victal e Knight (2009) corroboraram com os autores anteriormente citados ao verificarem que em bebidas lácteas, elaboradas com cultura mista e com probióticos, houve inibição do desenvolvimento de coliformes totais decorrente da acidez formada, entretanto a *E. coli* teve o crescimento inibido apenas nas bebidas fermentadas com os probióticos.

Kayser (2007) observou que as bactérias lácticas naturalmente encontradas em embutidos curados foram capazes de produzir compostos com atividades antimicrobianas frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* spp.

Ruiz et al. (2009) testaram a sensibilidade de *E. coli*, patógeno de enfermidade urogenital, frente a duas estirpes de *Lactobacillus* spp. e a antimicrobianos usualmente utilizados no tratamento e observaram que os halos de inibição formados pelos lactobacilos, devido a produção de bacteriocinas, foram significativamente maiores que os provenientes dos antimicrobianos.

A ação antagonista das culturas lácticas comprovada na literatura tem sido utilizada com o objetivo de otimizar a qualidade sanitária de produtos maturados e frescos não

somente na indústria laticinista. Bactérias ácido lácticas e as respectivas bacteriocinas tem sido aplicadas com sucesso como antimicrobianos em carnes, diminuindo a possibilidade do crescimento de microrganismos como *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*. Além disso, podem atuar na redução de nitrato e nitrito, utilizados como conservantes, até nitrogênio elementar, diminuindo assim a formação das nitrosaminas que são consideradas compostos cancerígenos (BALDUINO et al., 1999).

O efeito de cultivos probióticos sobre microrganismos patogênicos tem resultados divergentes visto que há variações nos cultivos utilizados, assim como nas técnicas de elaboração (BARRANTES et al., 2004).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS LÁTICAS FRENTE AO CRESCIMENTO DE ESTIRPES PATOGÊNICAS

RESUMO

As bactérias ácido lácticas possuem interesse industrial por serem fundamentais no processamento de fermentados e inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, através da competição por nutrientes ou produção de substâncias antagonistas. No presente estudo avaliou-se *in vitro*, em placas de Petri com agar MRS, a ação antagonista de 30 repiques de *Lactobacillus acidophilus* e 30 repiques de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre estirpes patogênicas de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Foi observado formação de halos de inibição, variando de 6 a 18 mm de diâmetro, frente aos patógenos pelos repiques das culturas lácticas testadas, indicando a possibilidade de produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas ou outras substâncias inibidoras de crescimento. Considerando o estudo dos 60 repiques de bactérias ácido lácticas analisados frente a cada microrganismo patogênico, 46,7% apresentaram atividade antagonista sobre *S. aureus*, 46,5% inibiram *E. coli* e 29,9% *L. monocytogenes*.

Palavras chave: halo de inibição, cultura láctica, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are industrially attractive because they are fundamental in fermented products processing and inhibit or retard the growth of spoilage and pathogenic microorganisms through nutrient competition or antagonistic substances production. In this study, the antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in pathogenic strains of *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* was evaluated *in vitro*, in Petri dishes with MRS agar. Formation of inhibition halos was observed against pathogens by strains of lactic cultures tested, indicating the possibility of producing organic acids, bacteriocins or other inhibitory growth substances.

Keywords: inhibition halos, lactic culture, *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda por técnicas de bioconservação, a aplicação de bactérias lácticas como cultura “starter”, ou seja, iniciadora de fermentação, tem sido uma técnica extensivamente explorada pelas indústrias.

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) pertencem ao grupo de bactérias Gram positivas, bastonetes curvos e curtos, às vezes na forma de cocos ou bacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, são estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém aerotolerantes, e geralmente catalase negativas (KANDLER; WEISS, 1986).

As BAL compõem a microbiota normal que se desenvolve após o processamento de alguns alimentos e cujas atividades metabólicas contribuem para as características sensoriais desejáveis nos produtos e para inibir ou retardar a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Normalmente, agem por exclusão competitiva e síntese de substâncias antagonistas como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ALEXANDRE et al., 2002; CHESCA et al., 2009; FONTES et al., 2005; GUERRA; BERNADO, 2005; MARTINIS et al., 2003).

Os principais metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas são os ácidos orgânicos, destacando-se o ácido láctico que pode diminuir o pH do meio, o que seria suficiente para exercer efeito de inibição sobre muitos microrganismos (COGAN; ACCOLAS, 1990; REDONDO, 2008).

As bacteriocinas são compostos protéicos sintetizados no ribossomo celular bacteriano com atividade antimicrobiana, entretanto, a célula produtora é considerada imune (JACK et al., 1995). São utilizadas como bioconservantes, sendo a nisina a única produzida comercialmente e com uso aprovado em alimentos (CLEVELAND et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados como culturas probióticas, pois além de contribuírem para as características sensoriais do produto final, aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, proporcionando benefícios fisiológicos ao consumidor (BIELECKA et al., 2002; BOYLSTON et al., 2004; FRANCO et al., 2006; FULLER, 1989; KEMPKA, 2008).

É notório que os alimentos possam ser veículos de microrganismos capazes de reduzir a validade do produto, assim como transmitir agentes etiológicos de determinadas enfermidades ao consumidor; destacando-se *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 e *Staphylococcus aureus*.

A *Listeria monocytogenes* encontra-se disseminada na natureza e em diversos tipos de alimentos *in natura* ou processados. Com o aumento do consumo de produtos refrigerados tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos a partir da década de 80 (GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005; LOGUERCIO et al., 2001; MENA et al., 2004).

A listeriose é uma zoonose de relevância em saúde coletiva devido à gravidade da manifestação clínica, resultante do comprometimento do sistema nervoso central, alta mortalidade, longo período de incubação e prevalência particular em indivíduos imunocomprometidos, idosos, crianças, recém-nascidos e gestantes (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005; LOGUERCIO et al., 2001).

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. O significado da presença em alimentos deve ser avaliado por indicar contaminação microbiana de origem fecal, portanto condições higiênicas insatisfatórias, e eventual presença de enteropatógenos. Outro aspecto a ser considerado é que diversas estirpes são comprovadamente patogênicas para o homem e animais, dentre essas a *E. coli* O157:H7, implicada como agente etiológico da colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Staphylococcus aureus é causador de intoxicação provocada pela ingestão de alimentos com a toxina pré-formada, com período de incubação de uma a oito horas, e sintomas como náusea, cefaléia, dores abdominais, vômitos e diarreia. Os principais reservatórios são os humanos e os animais, visto que tem como habitat a pele, mucosas e trato respiratório superior (HAJDENWURCEL, 2004).

O leite e derivados são frequentemente incriminados em quadros de intoxicação, não apenas pela contaminação pós-processamento através da manipulação ou utilização de culturas “starters” contaminadas, mas pela contaminação originária da mastite estafilocócica do gado leiteiro, uma vez que a enterotoxina não é destruída na pasteurização do leite (FRANCO; LANDGRAF, 2005; GERMANO; GERMANO, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus*, da cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* frente aos microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, do Depto de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF)-Niterói/RJ, onde foi avaliada *in vitro* a atividade antagonista do *Lactobacillus acidophilus* (LA5 Probiotic Culture Chr Hansen) e da cultura láctea mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen) frente ao crescimento de estirpes patogênicas utilizadas como culturas indicadoras: *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *Listeria monocytogenes* (isolada de amostras de carne bovina - UFF) e *Staphylococcus aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923). Os testes de inibição foram realizados semeando-se em duplicata com três repetições, de acordo com modificações nas técnicas de Tagg et al (1976) e Romeiro (2005), totalizando 180 cultivos semeados em 30 pontos para cada estirpe antagonista e indicadora.

O *L. acidophilus* e a cultura láctica mista foram ativados em tubos contendo leite desnatado reconstituído a 10% esterilizado e posteriormente em caldo MRS (Man Rugosa Shape; Acumedia 7543A), incubados ambos a 37°C por 48 horas em jarras de anaerobiose (Anaerobac). Após ativação, foram confeccionados esfregaços e realizada a coloração de Gram para posterior bacterioscopia e observação das características dos cultivos; assim como realizada a prova da catalase.

As culturas ativadas foram semeadas, quantidade de 30µL, em cinco poços equidistantes em placas contendo ágar MRS e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, as placas foram invertidas e adicionado a cada tampa papel de filtro esterilizado embebido com 1mL de clorofórmio por 20 minutos para inativação das culturas. As cepas indicadoras foram previamente ativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI /Acumedia 7116A) a 37°C por 24 horas e também observadas quanto as características em microscopia de imersão após confecção de lâminas coradas pelo método de Gram. Inoculou-se

0,1 mL de cada cepa indicadora em tubos contendo BHI semi-sólido que foram vertidos sobre a superfície das placas de ágar MRS com as culturas lácticas inativadas; método denominado de semeadura sobrecamada. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em aerobiose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos na presente pesquisa, demonstrados na Tabela 1, dos 30 repiques de *L. acidophilus* testados frente a *E. coli*, em 26,6% (oito) foi observada atividade antagonista confirmada pela produção de halos de inibição variando de 6 a 18 mm de diâmetro. Dos 30 cultivos de *L. acidophilus* avaliados com culturas de *L. monocytogenes*, 13,3% (quatro) apresentaram zona de inibição de 12 mm; e com *S. aureus* 16,6% (cinco) formaram halos de 12 mm e 3,3% (um) de 18 mm de diâmetro. No que concerne aos 30 repiques da cultura láctica mista tradicional (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) analisados sobre a *E. coli*, 3,3% (um) houve formação de halo de 10 mm e 16,6% (cinco) com halos de 12 mm de diâmetro. Quanto a *L. monocytogenes*, 16,6% (cinco) dos halos possuíam 12 mm de diâmetro. Os mesmos cultivos confrontados com *S. aureus* 13,4% (dois) produziram halos de 12 e também de 18 mm.

Repiques	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
	% / diâmetro do halo	% / diâmetro do halo	% / diâmetro do halo
<i>L. acidophilus</i>	26,6 / 6 a 18 mm	13,3 / 12 mm	16,6 / 12 mm
			3,3 / 18 mm
Cultura láctica mista	3,3 / 10 mm 16,6 / 12 mm	16,6 / 12 mm	13,4 / 12 mm
			13,4 / 18 mm
TOTAL	46,5%	29,9%	46,7%

TABELA 1 Porcentagem de repiques de *L. acidophilus* e de cultura láctica mista (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) com os respectivos diâmetros dos halos de inibição formados frente as estirpes de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Considerando o estudo dos 60 repiques de bactérias ácido lácticas analisados frente a cada microrganismo patogênico, 46,7% apresentaram atividade antagonista sobre *S. aureus*, 46,5% inibiram *E. coli* e 29,9% *L. monocytogenes*. Dos repiques de BAL testados no presente estudo, a cultura láctica mista (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) foi a que apresentou maior porcentagem de formação de halo de inibição frente as estirpes patogênicas.

Pesquisas similares foram encontradas na literatura consultada, como os de Carvalho (1996) e Prado et al. (2000) que isolaram 336 cepas de bactérias lácticas e obtiveram respectivamente 29,2% inibindo cepas de *Staphylococcus aureus* e 33,4% inibindo *Listeria monocytogenes*. Os resultados também foram similares aos de Dabés et al. (2001) que trabalharam com 288 cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos fermentados, das quais 67 apresentaram atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus* e 74 frente a *Listeria monocytogenes*; induzindo a afirmativa de que existe variação na sensibilidade dos microrganismos indicadores frente as substâncias produzidas e secretadas pelas bactérias lácticas. Entretanto, no presente trabalho, ao contrário dos resultados dos autores supracitados, *S. aureus* foi o microrganismo com maior porcentagem (46,7%) de halos de inibição.

Os achados desta pesquisa, também são equiparados aos de Alexandre et al (2002) que analisaram a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo minas artesanal e observaram que das 192 cepas isoladas 25% foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Porém, diferente dos 46,5% repiques formadores de halo de inibição frente a *E. coli* analisados neste estudo, os autores anteriormente citados, observaram que nenhuma das cepas isoladas foi capaz de inibir este microrganismo.

Os resultados deste experimento estão em concordância com os de Neto et al. (2005) que demonstraram a ação antagonista de bactérias ácido lácticas e identificaram que *Lactobacillus* spp. foi o que mais proporcionou inibição de microrganismos patogênicos testados, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli*. Por sua vez, Kayser (2007) demonstrou, através do teste de inibição direta por bactérias lácticas, porcentagens superiores as encontradas neste estudo, correspondentes a 95,23% de inibição para *Staphylococcus aureus* e 97,61% de inibição para *Listeria monocytogenes* frente as estirpes testadas.

González et al. (2006) ao estudarem o efeito de inibição de 395 estirpes de BAL isoladas de queijo maturado sobre as estirpes indicadoras de *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium tyrobutyricum* e *L. monocytogenes*, consideraram atividade inibitória positiva quando o halo formado apresentou diâmetro maior que dois milímetros (2 mm). No presente trabalho os diâmetros encontrados foram maiores que 2 mm, considerando-se, com base nos resultados achados, que as estirpes testadas tiveram efeito satisfatório de inibição sobre os microrganismos patogênicos indicadores.

Na atual pesquisa os diâmetros dos halos de inibição mensurados variaram de 6 a 18 mm, corroborando com os valores relatados na literatura como Balduino et al (1999) que observaram a formação de halos medindo 7 e 8 mm para *E. coli*, e entre 6 e 9 mm para *Staphylococcus aureus*. De modo similar, Chioda et al (2007) observaram a inibição de *Escherichia coli* BIA26 por todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* testadas, pela presença de halos variando de 9,0 a 15,0 mm de diâmetro. Por sua vez, Pereira e Gómez (2007) avaliaram a ação de *Lactobacillus acidophilus* sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e identificaram a produção de uma substância extracelular e difusível ocasionando o aparecimento de halos de inibição de 14,75 e 15,0 mm de diâmetro respectivamente. Também Poppi et al. (2008) analisaram a atividade antagonista de diferentes espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* em meio de cultura adicionado ou não de bicarbonato de sódio; e observaram formação de áreas de inibição variando de 6,0 a 11,5 mm para o meio neutralizado e de 9,0 a 13,5 mm de diâmetro no meio sem neutralização.

No presente trabalho não foi avaliada a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas lácticas, porém as atividades inibitórias verificadas foram justificadas, em literatura específica, pela difusão de substâncias inibidoras no ágar que impediram o crescimento das culturas patogênicas indicadoras, conforme relato de Pereira e Gómez (2007).

A atividade antimicrobiana direta produzida pela microbiota estudada nesta pesquisa pode ser devida a vários fatores como, por exemplo, a produção de ácidos orgânicos, de peróxido de hidrogênio, de diacetil, de dióxido de carbono, de acetaldeído e de bacteriocinas, entre outros.

Pinto (2008) observou que quanto maior a dose de fermento láctico inoculado aumentava-se a probabilidade de sobrepujar o crescimento de *L. innocua* e *L.*

monocytogenes pela produção de compostos com efeitos antagônicos ou pelo decréscimo de pH, em concordância com a ação antagonista verificada neste trabalho. Por sua vez, Chesca et al. (2009) isolaram bactérias ácido lácticas de queijos de baixa umidade e observaram significativa atividade inibitória frente a *L. monocytogenes* e *S. aureus*, sugerindo a produção de substâncias como bacteriocinas.

A atividade antagonista apresentada pelas bactérias lácticas, encontrada na pesquisa realizada, é considerada característica desejável em uma cultura probiótica; conferindo grande relevância para aplicações em alimentos.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, concluiu-se que determinadas culturas lácticas são capazes de inibir o crescimento de estirpes patogênicas, entretanto cepas da mesma espécie podem apresentar variações na formação de halos pela diferente quantidade e variação de substâncias antimicrobianas produzidas, conferindo especificidade. A atividade antagonista observada sobre estirpes patogênicas, pode constituir uma das vantagens do uso de culturas lácticas e probióticas na produção de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A.S.; HAULY, M.C.O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v.19, n.3, sept./dec. 1999.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.B.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, Toronto: Elsevier, Canadian Institute of Food Science and Technology, v.35, n.2/3, p.125-131. 2002.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, Elsevier, v.14, n.5, p.375-387, mai. 2004.

CARVALHO, C.R. *Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de embutidos cárneos, frente a Staphylococcus aureus*. Belo Horizonte, 1996, 71f.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

CHESCA, A.C.; CASTRO, H.K.; SILVEIRA, M.; D'ANGELIS, C.E.M. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos de Baixa Umidade Frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.23, n.174/175, p.123-128, jul/ago. 2009.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F.. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.71, p.1-20, dec. 2001.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk*. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, 1990. 301p., v. 1. p.77-114.

DABÉS, A.C.; SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v.53, n.1, feb. 2001.

FONTES, E.A.F.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A. Método Alternativo para Enumeração de Bactérias Lácticas. In: *Anais Eletrônicos do XXII Congresso Nacional de Laticínios*. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora, 18 a 21 de julho, 2005.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. Wiley Blackwell, Oxford, v. 66, n.5, p. 365-378, 1989.

GAHAN, C.G.M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*. Wiley Blackwell, Oxford, v.98, n.6, p.1345-1353, June. 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela. 2001. 629 p.

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.F. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese

throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*. Elsevier, v. 18, n.6, jun. p.726-722. 2007.

GUERRA, M.M; BERNARDO, F.M.A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria* spp. em queijos tradicionais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.100, n.555-556, p.185-188. 2005.

HAJDENWURCEL, J.R. *Atlas de Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2004, v.1. 66p.

JACK, R.W; TAGG, J.R; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Review*. American Society by microbiology, v. 59, p. 171-200, 1995.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KANDLER, OTTO; WEISS, NORBERT. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A. et al. Regular, Nonsporing Gram Positive Rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins. USA. v.2, cap. 14, p. 1208-1260. 1986.

KAYSER, V.L. *Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Embutidos Curados Frente à S. aureus, L. monocytogenes e Salmonella spp.* Frederico Westphalen, 2007, 37f. Monografia (Conclusão de Curso Ciências Biológicas) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Frederico Westphalen. Jul 2007.

KEMPKA, A.P; KRUGER, R.L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHER, H.; CANSIAN, R., OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.0, p. 170-177, dez. 2008.

LOGUÉRCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan/fev. 2001.

MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. Elsevier, v. 21, n. 2, p. 213-216, abr. 2004.

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D.P.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos Gram-positivos. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v. 11, n. 4, p. 322-328, out./dez. 2008.

NETO, L.G.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PINTO, M.S. *Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre Listeria spp. e Staphylococcus aureus em queijo mineiro artesanal do Serro*. Viçosa, 2008, 71 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2008.

POPPI, L.B.; MANCILHA, I.M.; FERREIRA, A.J.P.; LEAL, D.D.M. Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes in vitro*. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v.11, n.2, p.113-119, abr/jun, 2008.

PRADO, C.S.; SANTOS, W.L.M.; CARVALHO, C.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v.52, n.4, p.417- 423, aug. 2000.

REDONDO, M.C. *Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416*. Araraquara, 2008, 71 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Araraquara, 2008.

ROMEIRO, R.S. *Constatação da Produção de Bacteriocinas por Isolamentos de Bactérias Fitopatogênicas*. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. MG. Brasil. 2005.

Disponível em: www.ufv.br/dfp/bac/uni15.pdf

Acesso em: maio 2007.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S; WANNAMAKER, L.M. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Review*. American Society Microbiology, v.40, n.3, p. 722-756, set. 1976.

3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E AÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM IOGURTE FRENTE A ESTIRPES PATOGÊNICAS

RESUMO

Bactérias Ácido Láticas (BAL) são tradicionalmente utilizadas na produção de leites fermentados, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e aroma, e com potencial em inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. No presente experimento foi elaborado leite fermentado com cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen). Após a elaboração do produto inoculou-se, em determinadas amostras, estirpes de *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *S. aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923) e *L. monocytogenes*. Foram analisados os teores de proteína, gordura e acidez do produto final. Durante o período de 35 dias de armazenamento sob refrigeração observou-se a acidez e a viabilidade da cultura láctica mista tradicional e das estirpes patogênicas inoculadas. O iogurte elaborado atendeu aos padrões de qualidade no que concerne às características físico químicas avaliadas e a viabilidade da cultura láctica, que apresentou ação antagonista total sobre *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*. Entretanto, *L. monocytogenes* manteve-se viável durante todo o prazo de armazenamento do produto, com redução de cinco ciclos logarítmicos na curva de crescimento.

Palavras chave: cultura láctica mista, inibição, fermentação, bioconservação, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacterias (BAL) are traditionally used in fermented milk production, contributing to development of flavor and aroma, and with the potential to inhibit the growth of undesirable microorganisms. In this study, fermented milk was produced with mixed lactic culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen). After development of product, in certain samples were inoculated strains of *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *S. aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923)

e *L. monocytogenes*. Protein fat and acidity levels of final product were analyzed. During storage of 35 days under refrigeration were observed the acidity and viability of mixed lactic culture of traditional and of inoculated pathogenic strains. The produced yogurt was in quality standards in physicochemical characteristics and viability of lactic culture, that presented total antagonistic action against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*.

Keywords: mixed lactic culture, inhibition, fermentation, bioconservation *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.

INTRODUÇÃO

Um dos recursos utilizados pelas indústrias para evitar que os alimentos sejam veículos de microrganismos deteriorantes e patogênicos é a bioconservação, que consiste na utilização de microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou intencionalmente adicionados, com capacidade de inibir o crescimento dos considerados indesejáveis.

Cientificamente há relatos de que os processos de conservação, usualmente adotados pelas indústrias, interferem na qualidade nutricional dos alimentos e que os conservantes químicos podem ser tóxicos e prejudiciais à saúde do consumidor.

O processo denominado bioconservação tem crescente aplicação na indústria de laticínios, e as BAL são os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores devido às características antagônicas ao crescimento bacteriano.

Segundo Jay (2005), o grupo das bactérias ácido lácticas é composto por doze gêneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella*.

Os microrganismos componentes da microbiota fermentadora são denominados de cultivos iniciadores ou “starters”, reconhecidos como “Generally Recognized As Safe” (GRAS), constituindo um preparo de culturas selecionadas, de grande número de células de pelo menos um microrganismo, com vistas a ser acrescentado a matéria prima e promover de maneira controlada o processo de fermentação e a padronização do produto final (LEROY; VUYST, 2004; OLIVEIRA, et al., 2002).

A fermentação é um método de preservação utilizado desde os primórdios da civilização, no qual lactose é transformada em ácido láctico, o pH do leite se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas que se precipitam, formando assim a massa característica do iogurte (FARIA et al., 2006; TAMINE, 1990).

Iogurte é definido na legislação como o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, por fermentação láctea mediante a ação protosimbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, aos quais pode-se complementar outras bactérias ácido lácticas (BRASIL, 2008; BRASIL, 2007).

As atividades metabólicas da microbiota GRAS contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis no produto, como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima. Além de proporcionarem sabor, textura e incrementarem o valor nutricional dos alimentos podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por competição direta por nutrientes e pela produção de compostos antagônicos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ALEXANDRE et al., 2002; CHESCA et al., 2009; GUERRA; BERNADO, 2005; MARTINIS et al., 2003; PEREIRA; GOMÉZ, 2007). As bactérias ácido lácticas são divididas em dois grupos com base nos produtos finais do metabolismo da glicose; as designadas homofermentativas produzem ácido láctico como único ou principal produto da fermentação pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), e as heterofermentativas produzem a mesma quantidade molar de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir das hexoses (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

Durante a fermentação as bactérias do iogurte, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, crescem em simbiose. No início, o pH do leite em torno de 6,5 favorece ao desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus*, iniciando a produção de ácido no meio devido à conversão da lactose. Com o aumento da acidificação ocorre o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que são proteolíticos, obtêm aminoácidos a partir da degradação da caseína (glicina, histidina, valina) e ativam o crescimento do *Streptococcus* spp. que, por sua vez, estimula o crescimento dos lactobacilos, com a produção de ácido fórmico e gás carbônico. Procura-se manter o equilíbrio adequado das bactérias, para que o produto permaneça

suficientemente ácido e aromático (LACERDA et al., 2007; REIS et al., 2007; RODAS et al., 2001; TAMINE; DEETH, 1980; VEISSEYRE, 1988).

Existem relatos de que o produto fermentado é incriminado em surtos alimentares envolvendo patógenos como *E. coli*, *S.aureus* e *Listeria monocytogenes*, apesar de ser considerado como alimento seguro pelo baixo pH e capacidade da cultura láctica de inibição de microrganismos.

Em estudos realizados, demonstrou-se que a *Escherichia coli* O157:H7 ocupa o segundo lugar entre as bactérias enteropatogênicas responsáveis por casos de diarreia não específica; é o microrganismo mais frequente em diarreia sanguinolenta e agente etiológico da síndrome urêmica hemolítica (BARRANTES et al., 2004).

A confirmação de vários casos esporádicos e surtos de listeriose na década de 80, associados ao consumo, principalmente, de queijos e de vegetais crus, levou a inclusão de *L. monocytogenes* na lista de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos. A partir dessa década, um grande número de surtos e casos de listeriose tem sido relatado na literatura, alguns relacionados a leite e produtos lácteos, sendo considerado relevante pela gravidade da manifestação clínica e alta mortalidade principalmente no considerado grupo de risco (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

O *S. aureus* é causador de intoxicação provocada pela ingestão de alimentos com a toxina pré-formada, o período de incubação é duas a quatro horas em média, ocasionando sintomas como náusea, cefaléia, dores abdominais, vômitos e diarreia (BORGES et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivos a elaboração de iogurte com cultura láctica mista tradicional de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, a análise da viabilidade dos microrganismos e acidez durante o período de armazenamento, de acordo com a legislação; avaliação físico química do produto final; inoculação das estirpes patogênicas de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e a observação da ação antagonista da cultura láctica frente aos patógenos indicadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O iogurte foi elaborado no laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói/RJ, respeitando as devidas práticas higiênicas de fabricação. A matéria prima utilizada foi o leite UHT integral, previamente analisado quanto a contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa de *S. aureus* e pesquisa de *E. coli* empregando-se o teste rápido Rida[®] Count, seguindo a metodologia do fabricante. Realizou-se também a pesquisa de resíduos de antimicrobianos com o teste Eclipse (CAP-LAB), mensurou-se o pH e a acidez, com peagômetro e pelo método de Dornic respectivamente, e a crioscopia com auxílio de crioscópio eletrônico (MC5400). As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, da mesma faculdade, e os resultados obtidos atenderam ao padrão estipulado pelo regulamento técnico de identidade e qualidade do produto (BRASIL, 1997). Os valores da crioscopia, do pH e da acidez foram respectivamente -0,55°H, 6,5 e 18°Dornic (°D); confirmando a qualidade desejável da matéria prima para elaboração do iogurte.

A cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (YF-L903 Thermophilic Yoghurt Culture Chr Hansen) foi diluída em 500 mililitros (mL) de leite em pó desnatado reconstituído esterilizado e imediatamente usada em percentagem de inoculação de 50UI DVS para 500 litros de leite. Elaboraram-se 25 litros de iogurte em tanque de aço inoxidável, anteriormente higienizado. Após adição da cultura e homogeneização, o produto foi envasado em garrafas plásticas do tipo pet (Emballi[®]) de 250 mL, previamente esterilizadas em autoclave, e incubado em estufa a temperatura de 45°C durante o tempo necessário para atingir pH correspondente a 4,5.

A princípio a acidez do produto foi mensurada de hora em hora pelo método de Dornic e com auxílio de peagômetro, seguindo a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 68, para acompanhar o processo de fermentação (BRASIL, 2006). Após alcançar a acidez desejada, as garrafas foram retiradas da estufa e classificadas em amostras controle (25 garrafas), contendo apenas o inóculo da cultura láctica mista, e amostras indicadoras (75 garrafas) inoculadas com estirpes patogênicas.

As estirpes patogênicas utilizadas como culturas indicadoras foram *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *Staphylococcus aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923) e *Listeria monocytogenes* (isolada de amostras de carne bovina - UFF). Os microrganismos foram semeados para ativação em ágar Nutriente e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. As culturas foram transferidas para solução salina esterilizada com auxílio de alça de platina até que a concentração alcançasse a escala 1,0 de MacFarland. Inoculou-se suspensão de um mililitro de cada estirpe, separadamente pós-fermentação, em 250 mL de iogurte, totalizando 25 garrafas de iogurte para cada microrganismo patogênico indicador.

Todas as culturas antes de serem inoculadas foram avaliadas quanto a morfologia bacteriana em microscópio de imersão, após confecção de esfregaços em lâminas e coloração pelo método de Gram.

A amostra controle foi analisada quanto ao teor de gordura pelo método de Gerber e teor de proteína pelo método de Kjeldahl, de acordo com metodologia preconizada na Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006).

As amostras controle e indicadoras foram armazenadas em refrigeração a 5°C durante um período de 35 dias para realização das análises microbiológicas e avaliação da acidez nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 18, 21, 22, 23, 28 e 35.

O pH e a acidez titulável foram mensurados nas amostras controles, nos dias de armazenamento determinados. O pH foi medido com auxílio de peagômetro Quimis (Modelo Q400HM) em 10 mL de amostra retirados das garrafas. O eletrodo do pH foi calibrado com solução tampão (Merck®) de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável foi monitorada pesando-se 10 mg da amostra e adicionando-se 10 mL de água destilada aquecida e isenta de gás carbônico (60°C). Após homogeneização, adicionou-se à amostra cinco gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N sob agitação, até ponto final detectável pelo aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos (BRASIL, 2006). A quantidade de NaOH em mL foi registrada e convertida em gramas de ácido láctico.

As análises bacteriológicas foram realizadas nas amostras controle e indicadoras nos dias de armazenamento determinados, procedendo-se previamente as diluições seriadas em solução salina peptonada 0,1% até 10¹².

Nas amostras controle foi realizado a contagem de bactérias ácido lácticas em ágar Man Rugosa Shape (MRS, Acumedia 7543A) por semeadura em profundidade e em

dupla camada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 72 horas.

Nas amostras indicadoras as contagens foram realizadas após semeadura em profundidade de 1 mL das amostras diluídas do produto com o microrganismo *E. coli* O157 em ágar Mac Conckey Sorbitol (Acumedia 7320 A) e *Listeria monocytogenes* em *Listeria Agar Selectivo Oxford* (Merck 7004). A partir das diluições das amostras do produto inoculado com *S. aureus*, coletou-se um inóculo de 0,1mL e semeou-se por espalhamento em superfície em placas com ágar Baird Parker (Merck 5406). As placas semeadas foram incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados correspondem a média das contagens. Os dados bacteriológicos foram convertidos para log UFC/mL e avaliados estatisticamente através da análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação do produto teve a duração de quatro horas, quando o iogurte atingiu o valor de pH correspondente a 4,5 e acidez a 0,7g ácido láctico/100mL de amostra, representado nas Figuras 1 e 2, e em conformidade com o especificado pela legislação (BRASIL, 2007).

Valor similar de pH (4,4) foi encontrado por Estrada et al. (1999) ao elaborarem leite fermentado com cultura “starter” de iogurte, porém com o período de fermentação de oito horas e o decréscimo da acidez para 0,98 g ácido láctico/100mL.

Após o período de fermentação e estocagem, os teores de proteína e gordura do produto final foram respectivamente 3,1% e 3,2%, correspondendo aos padrões de identidade do produto estabelecidos no regulamento vigente (BRASIL, 2007).

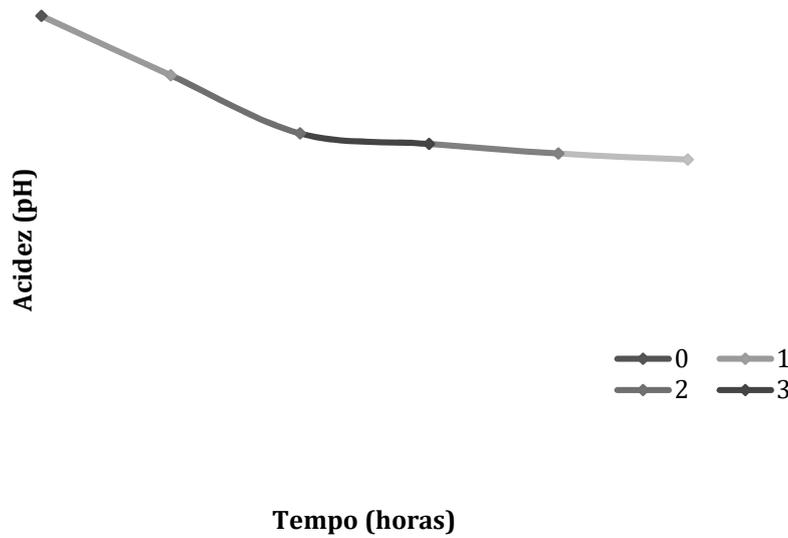


Figura 1 Resultados (valores médios) da acidez (pH) durante quatro horas de fermentação do iogurte.

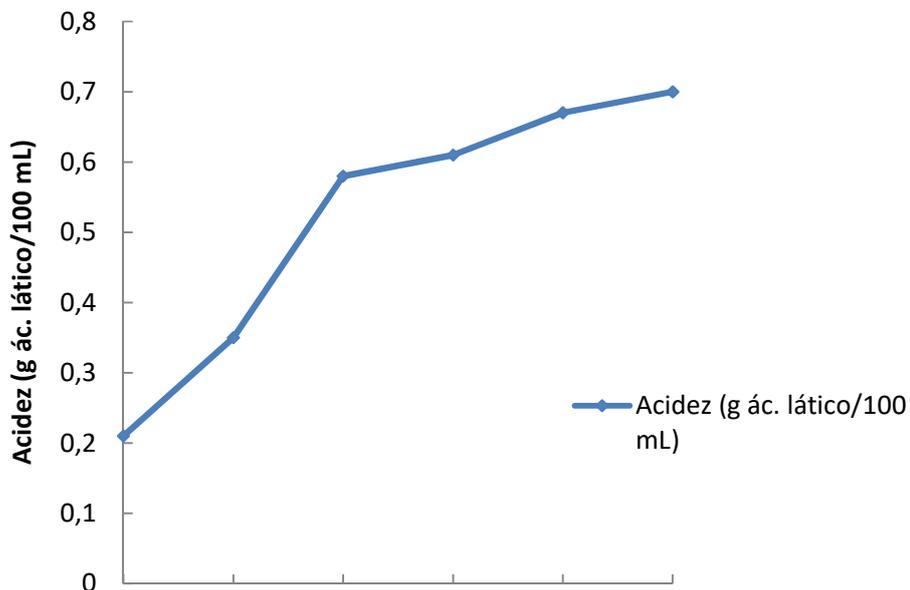


Figura 2 Resultados (valores médios) da acidez titulável (gramas de ácido láctico/100 mL) durante quatro horas de fermentação do iogurte.

No decorrer do período de armazenamento sob refrigeração houve aumento da acidez com redução do pH do iogurte. O pH final do produto foi de 4,2 e acidez titulável de 1,08 g ácido láctico/100 mL de amostra, apresentando variações que podem ser observadas nas Figuras 3 e 4. Os valores médios de acidez, expressados em ácido

lático, se encontravam na faixa estabelecida pela legislação brasileira em vigor correspondente a acidez mínima de 0,6g de ácido láctico/100 g de produto e máxima de 1,5g de ácido láctico/100 g de produto (BRASIL, 2007).

A redução do pH e o conseqüente aumento da acidez ocorreram pela formação de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, a partir da fermentação de carboidratos pelas bactérias lácticas. O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, utilizado no presente experimento, é citado na literatura como o responsável pelo fenômeno denominado pós acidificação que favorece ao aumento de acidez durante o armazenamento sob refrigeração; dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de estocagem, do poder acidificante da cultura e da manutenção da galactosidase (DAVE; SHAH, 1998; KAILASAPATHY, 2006; TAMINE; ROBINSON, 1991).

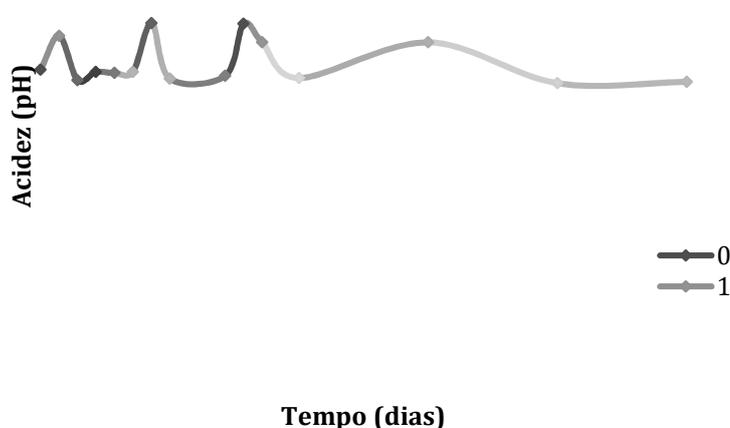


Figura 3 Variação da acidez (pH) do iogurte durante 35 dias de estocagem sob refrigeração a 5°C.

A faixa de pH verificada nesta pesquisa encontra-se no limite mencionado por Rodas et al. (2001), que ao analisarem iogurtes de diferentes marcas, verificaram que todas encontravam-se entre 3,6 e 4,2, no qual o crescimento das bactérias lácticas normalmente não é prejudicado. Resultados similares foram citados por Barrantes et al. (2004) que observaram valores entre 3,6 e 4,0 nos iogurtes avaliados; e por Soave

e Lacerda (2007) que obtiveram pH entre 4,0 e 4,7 em bebidas lácteas elaboradas com cultura láctica mista tradicional; considerando a acidez importante fator para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos.

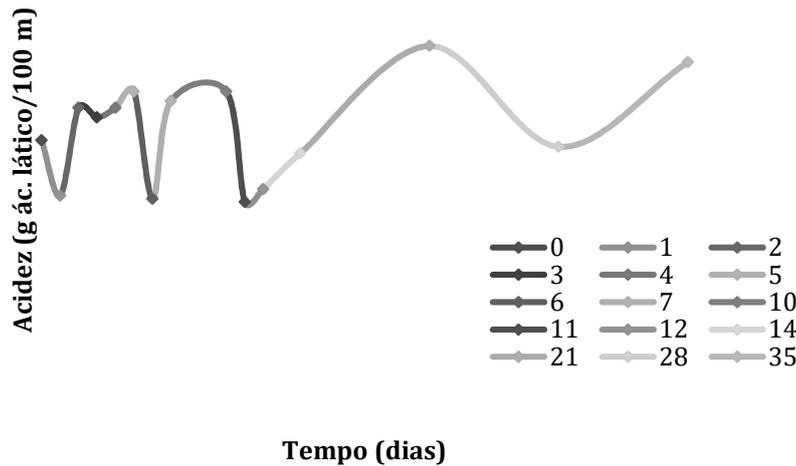


Figura 4 Variação da acidez titulável do iogurte (gramas de ácido láctico/100mL) durante 35 dias de estocagem sob refrigeração a 5°C.

Estrada et al. (1999) também encontraram, para o iogurte preparado, valor final de pH correspondente a 4,1, semelhante ao deste trabalho; porém a acidez titulável de 1,32 g ácido láctico/100g.

A relação entre contagens de células bacterianas (Y) e tempo de armazenamento (X) do produto foi estudada através da análise de regressão sugerindo a formação de uma reta no gráfico, sendo avaliada pelas equações lineares representadas na Tabela 1.

AMOSTRA	MODELO DE EQUAÇÃO	R ²	Pi>F
C	Y=14,84-0,51X	0,84	0,0001
I1	Y=9,82-0,76X	0,78	0,0001
I2	Y=10,56-0,67X	0,92	0,0001
I3	Y=9,18-0,30X	0,86	0,0001

Tabela 1 Equação Linear de Regressão. C= amostra controle (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*); I1= Amostra Indicadora 1 (*E. coli* O157:H7); I2= Amostra Indicadora 2 (*S. aureus*); I3= Amostra Indicadora 3 (*L. monocytogenes*).

Y= contagem de células bacterianas

X= tempo em dias de armazenamento do iogurte

Durante o período de 35 dias de estocagem do iogurte, as contagens de UFC correspondentes a cultura láctica mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* variaram entre 14 log a 7,4 log UFC/mL, como representado no gráfico da Figura 5. Apesar da redução na concentração bacteriana durante o armazenamento, os valores encontrados estão associados a manutenção da viabilidade dos microrganismos no iogurte, desejável durante todo o período, e em conformidade com o estipulado pela legislação que determina que os microrganismos “starter” devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante o prazo comercial, apresentando uma contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo 10⁷ UFC/g (BRASIL, 2007).

Para garantir a viabilidade da cultura láctica pelo prazo comercial, as empresas fornecedoras tem por hábito trabalhar com concentrações liofilizadas mais elevadas do que o exigido por lei, e também a orientação de manutenção do produto final em temperatura de refrigeração é primordial; visto que pode ocorrer a pós acidificação. Esse procedimento técnico justifica a concentração inicial de bactérias lácticas utilizada no presente trabalho e o resultado obtido no prazo final de estocagem.

A redução de BAL viáveis observada neste experimento foi detectada de maneira similar por Perez et al. (2007) que afirmaram que a contagem tende a variar até o final do período de estocagem do iogurte, na maioria dos casos declinando. Nos achados das análises de Miguel e Rossi (2003) ocorreu redução da ordem de dois ciclos logarítmicos ao longo do período de seis meses de estocagem do sorvete de iogurte, tanto para cocos quanto para bacilos, sem apresentar aspectos negativos que

descaracterizassem o produto; este comportamento também foi observado no presente trabalho, entretanto com redução de sete ciclos logarítmicos.

Por sua vez, Haully et al (2005) observaram que o número de bactérias lácticas viáveis presentes no iogurte de soja suplementado com inulina e oligossacarídeos no vigésimo oitavo dia de armazenamento foi superior aos valores mínimos necessários para caracterizar um alimento probiótico, entretanto, diferente do resultado desta pesquisa, o mesmo não foi observado no iogurte sem suplementação.

Nas amostras indicadoras a população inicial das culturas patogênicas foi de 8,3 log UFC/mL e as contagens foram gradativamente decrescendo a partir do terceiro dia de armazenamento. Observando-se a Figura 5, correspondente a curva de crescimento bacteriano, nota-se que as fases estacionárias e de declínio foram mais extensas; significando pouca capacidade de crescimento nas condições impostas pelo meio, tais como pH, baixa concentração de nutrientes, presença de compostos antagônicos.

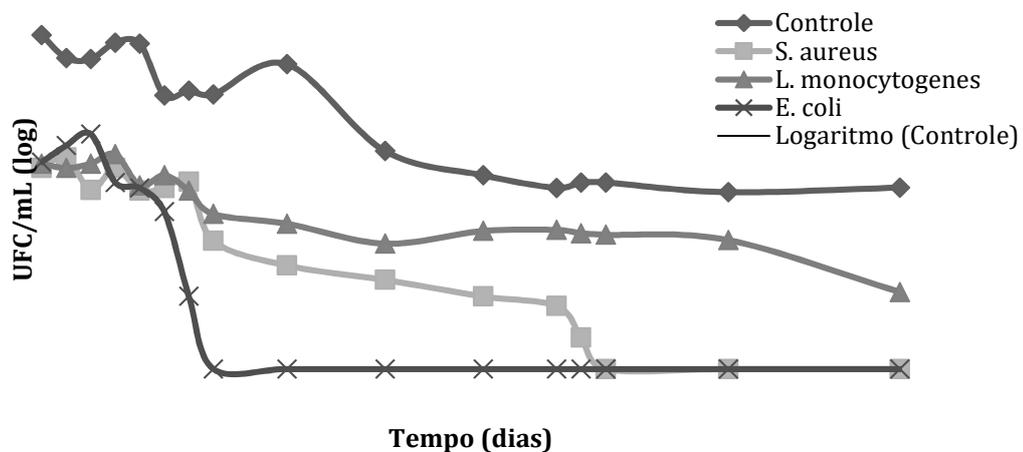


Figura 5 Resultado das contagens bacteriológicas, em UFC/mL, das amostras controle (C) (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*); e das amostras indicadoras de *E. coli* O157:H7 (I1), de *S. aureus* (I2) e *L. monocytogenes* (I3), dos iogurtes armazenados a 5°C por 35 dias.

Escherichia coli (I1) sobreviveu no iogurte até o sexto dia de estocagem, com contagens variando de 8,3 log a 3,0 log UFC/mL; não sendo detectável a partir do sétimo dia.

S. aureus (I2) apresentou viabilidade até o vigésimo segundo dia, com contagens oscilando de 8,3 log a 1,3 log UFC/mL, observando-se a lise celular a partir do vigésimo terceiro dia de armazenamento.

A *Listeria monocytogenes* (I3) manteve-se viável durante todo o prazo de armazenamento do produto, entretanto houve redução de cinco ciclos logarítmicos e variações de contagem de 8,3 log a 3,2 log UFC/mL. Esse resultado descaracteriza o produto visto que, de acordo com a legislação, é preconizada a ausência de *L. monocytogenes* em alimentos (BRASIL, 2001).

O efeito antagonista observado pode ser justificado pela capacidade das bactérias ácido lácticas em sintetizar diversos compostos bactericidas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, responsáveis por inibir o crescimento da microbiota indesejável (FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006; GUERRA; BERNARDO, 2005). Também, tem influência o fato de as estirpes de bactérias lácticas e o microrganismo indicador patogênico se desenvolverem ao mesmo tempo, proporcionando a inibição por competição pelos nutrientes presentes no meio.

Como observou-se neste experimento a variação de acidez, inclusive a fase de pós acidificação, provavelmente devido a formação de ácido láctico originado do metabolismo da microbiota láctea utilizada, foi um dos fatores que mais favoreceu a ação antagonista frente as estirpes patogênicas indicadoras.

Dado semelhante foi obtido por Estrada et al. (1999) que também verificaram alteração de acidez que ocasionou a redução do ciclo logarítmico do *S. aureus* culminando com o desaparecimento do microrganismo após o décimo dia de armazenamento.

Todavia, para que ocorra a inibição do crescimento bacteriano um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos exerce influência determinando a estabilidade microbiológica e o prazo comercial do produto, e consistindo no denominado conceito dos obstáculos tecnológicos (FRANCO; LANDGRAF, 2005). No iogurte elaborado com cultura láctica mista, no presente experimento, a intensidade dos obstáculos reduziu o crescimento de *L. monocytogenes*, mas não foi suficiente para destruição total. A eficiência da tecnologia dos obstáculos também é dependente da carga microbiana inicial, sugerindo-se que doses contaminantes mais baixas que a utilizada nesta pesquisa possam proporcionar a ação antagonista completa.

Donelly e Briggs (1986), Sorrells et al. (1989) e Gahan et al. (1996) ao estudarem as condições de adaptação de *Listeria monocytogenes* ressaltaram como fator relevante

o fenômeno de resposta ácido tolerante e a capacidade do microrganismo em se multiplicar a baixas temperaturas. Em concordância com os autores consultados, estas seriam as possíveis causas que impediram a inibição total do crescimento de *Listeria monocytogenes* no iogurte elaborado neste experimento.

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, como no trabalho desenvolvido por Shaack e Marth (1988) que demonstraram a sobrevivência de *L. monocytogenes* durante a fermentação de leite desnatado, na presença de *Lactococcus* spp. e durante 12 dias no iogurte. Porém, Guerra e Bernardo (2005) também não verificaram o efeito antagônico nos queijos elaborados com cultura láctica e contaminados por *Listeria* spp. Contudo, Poppi et al. (2008), ao contrário do observado no presente trabalho, constataram o efeito inibitório de estirpes de *Lactobacillus* spp. sobre *Listeria monocytogenes* devido provavelmente a produção de ácidos orgânicos, uma vez que com a adição de bicarbonato de sódio ao meio o microrganismo foi capaz de se manter viável.

Trabalho similar foi desenvolvido por Barrantes et al. (2004) que analisaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas em iogurte, porém, obtiveram resultados diferentes aos desta pesquisa, uma vez que verificaram o desaparecimento de *L. monocytogenes* no vigésimo dia de armazenamento e a viabilidade de *E. coli* O157:H7 durante os 28 dias .

Por sua vez, Calderón et al. (2007) observaram a redução da população de *S. aureus* em níveis não detectáveis, em iogurte tradicional sem adição de probiótico, em 16 dias de armazenamento; de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em 20 dias.

Dados semelhantes foram obtidos por Govaris et al. (2002) que relataram a inibição do crescimento de *E. coli* O157:H7 em iogurte de leite de ovelha, iogurte de leite de vaca e iogurte de soro de leite contaminados pós fermentação após 17, 14 e 12 dias de estocagem respectivamente.

Os achados desta pesquisa são equiparáveis ao de Bastos (2009) que avaliou a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em iogurtes elaborados com cultura láctica mista tradicional, contaminados pós fermentação e observou, durante os 30 dias de estocagem sob refrigeração, permanência das contagens de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. entre 8-9 log UFC/mL e o patógeno foi inibido a partir do quinto dia de estocagem.

A diversidade de resultados encontrados na literatura e comparados com o presente estudo é explicada pela existência de fatores que interferem diretamente na capacidade antagonista das BAL como o estágio de contaminação, a dose do inóculo contaminante, o tipo de cepa, a ácido resistência, a quantidade e o tipo de bactéria ácido láctica utilizada, a composição do meio, entre outros (HSIN-Y; CHOU, 2001; KASIMOGLU; AKGÜN, 2004; MUFANDAEDZA et al., 2006; NASCIMENTO, 2007).

Os fatores anteriormente mencionados, que podem ter influenciado nos resultados obtidos nesta pesquisa, foram ressaltados nos trabalhos de Hsin-Yi e Chou (2001) que avaliaram a sobrevivência de dois diferentes tipos de estirpe de *E. coli* O157:H7, com características ácido adaptada e não ácido adaptada, em iogurte comercial inoculado com 6,0 log UFC/mL. Ambas as estirpes foram inibidas durante a estocagem a 7,0°C, entretanto, um tipo não foi detectável a partir do quarto e quinto dias para células ácido adaptadas e não ácido adaptadas, respectivamente; enquanto a outra estirpe apresentou-se mais resistente sendo inibida após o sétimo dia, independente da característica de adaptação ao meio ácido. Moreno et al. (1999) demonstraram que a adição direta de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas em cultivos de *L. innocua*, dependendo da concentração inicial utilizada, proporcionou a redução máxima do crescimento das células bacterianas. Kasimoglu e Akgün (2004) estudaram concentrações diferentes do inóculo de *E. coli* O157:H7, correspondentes a 10², 10⁴ e 10⁶ UFC/mL, em iogurte com contagens de bactérias ácido lácticas em torno de 10⁹ UFC/mL e observaram o efeito inibitório em 48 horas de armazenamento para 10² e 10⁴ UFC/mL e 72 horas para 10⁶ UFC/mL.

Após análise dos resultados encontrados neste experimento conclui-se que o iogurte elaborado manteve as características físico químicas e a viabilidade das BAL em conformidade aos padrões determinados na legislação vigente durante o prazo de 35 dias de estocagem sob refrigeração. No que concerne a ação antagonista das BAL, obteve-se inibição total do crescimento de *E. coli* O157:H7 a partir do sétimo dia de armazenamento e de *S. aureus* após o vigésimo terceiro dia, e redução do ciclo logarítmico de *L. monocytogenes*, comprovando a capacidade conservadora das BAL, entretanto com possível comprometimento por fatores internos e externos que devem ser estudados e considerados no momento da elaboração do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v.54, n.3, sep. 2004.

BASTOS, P.A.M.B. Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurtes. Bom Jesus do Itabapoana, 2009, 83f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Bom Jesus do Itabapoana -R.J., 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 07/07/1952, revisado em 08/07/2008. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 8, 12 de dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). *Diário Oficial da União*, Brasília. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 de out. 2007. Seção 1, pt. 5.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y.. *Staphylococcus* Enterotoxigênicos em Leite e Produtos Lácteos, suas Enterotoxinas e Genes Associados: Revisão. *Boletim CEPPA*. Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

CALDERON, O; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas, v.57, n.1, mar. 2007.

CHESCA, A.C.; CASTRO, H.K.; SILVEIRA, M.; D'ANGELIS, C.E.M. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos de Baixa Umidade Frente a

Staphylococcus aureus ATCC6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.23, n.174/175, p.123-128, jul/ago. 2009.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria on yogurt. *Journal of Dairy Science*. Elsevier, v.81, n.11, p.2804-2816, nov.1998.

DONELLY, C.; BRIGGS, E. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *Journal of Food Protection*. v.49, 994-998, 1986.

ESTRADA, A.Z.; MENDOZA, R.S.; LA GARZA, L.M.; FERADO, J.O. Behavior of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in milk fermented with a yogurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Asociación Latinoamericana de Microbiología. v. 42, p. 5-10, 1999.

FARIA, C. P.; BENEDET, H.D.; LE GUERROUE, J.L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.41, n.3, mar., p.511-516. 2006.

FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

GAHAN, C; O`DRISCOLL, B.; HILL, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Food Technology*. American society for Microbiology, v.62, p. 3128-3132.1996.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPANICOLAOU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows' milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*. Cambridge University Press, v. 69, n.4, p. 655-660. 2002.

GUERRA, M.M; BERNARDO, F.M.A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria* spp. em queijos tradicionais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.100, n.555-556, p.185-188. 2005.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; FERREIRA, S.H.P. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista de Nutrição*. *Brazilian Journal of Nutrition*. Campinas, v.18, n.5, p.613-622, set/oct. 2005.

HSIN-YI, C.; CHOU, C-C. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiol.* v.70, n.1-2, p.189-195, out. 2001.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT- Food Science and Technology*. Oxford, v. 39, n. 10, p.1221-1227, 2006.

KASIMOGLU, A.; AKGÜN, S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. *International Journal of Food Science & Technology*. v.39, n. 5, p.563-568, mai. 2004.

LACERDA, T.M.; KOBAYASI, M.S.; ALCARDE, V.E. Preparação de bebidas lácteas empregando fermentação contínua e descontínua, utilizando como substrato diferentes concentrações de soro e queijo e otimização dos dados de fermentação. In: *15º Congresso de Pesquisa. 5ª amostra Acadêmica UNIMEP*. Piracicaba, 22-25 de outubro de 2007.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, v.15, n.2, p.67-78, feb. 2004.

MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MIGUEL, D.P.; ROSSI, E.A. Viabilidade de Bactérias Ácido Lácticas em sorvetes de logurte Durante o Período de Estocagem. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Araraquara, v.14, n.1, p.93-96. 2003.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. v.19, n.1, jan./apr. 1999.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B.; GADAGA, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.108, n.1, p.147-152, abr. 2006.

NASCIMENTO, M.S. *Caracterização da Atividade Antimicrobiana e Tecnológica de Três Culturas Bacteriocigênicas e Avaliação de sua Eficiência no controle de Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus e Bacillus cereus em Queijo Minas Frescal*. Campinas, 2007. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências*

Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo, v. 38, n. 1, jan./mar., p.1-21, 2002.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de Bactérias Lácticas em Iogurte Adicionado de Biomassa da Microalga *Spirulina platensis* Durante o Armazenamento Refrigerado. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Araraquara, v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 2007.

POPPI, L.B.; MANCILHA, I.M.; FERREIRA, A.J.P.; LEAL, D.D.M. Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes in vitro*. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v.11, n.2, p.113-119, abr/jun, 2008.

REIS, A.R.N.; GOULART, P.F.P.G; SILVEIRA, I.A. Elaboração de Bebida Simbiótica e Avaliação de sua Qualidade Sensorial e Microbiológica. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.21, n.151, p. 31-36, maio. 2007.

RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos – Food Science and Technology*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia, v.21, n.3, p. 304-309, set-dez. 2001.

SHAACK, M.M. E MARTH, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in skim milk and yoghurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. v.51, p.607-614.1988.

SOAVE, P.B.; LACERDA, THM. Acompanhamento da Vida Útil de Bebidas Lácteas: Influência do Soro do Queijo e Culturas Contendo Organismos Probióticos. In:15° Congresso de Iniciação Científica. V Amostra Acadêmica UNIMEP. Piracicaba, out, 2007, p.1-9.

SORRELLS, K.; ENIGL, D.; HATFIELD, J. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. v.52, p. 571-573.1989.

TAMINE, A.Y. Microbiology of "Starter Cultures". In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products*. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, v.2, p.131-201, 1990. 409p.

TAMINE, A.Y.; DEETH, H.C. Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*. USA: International Association for food Protection, v.43, n.12, p.939-977. 1980.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. *Yogur: Ciencia y tecnología*. Zaragoza: Editorial Acribia. España. 1991. 368p.

VEISSEYRE, R. *Lactología Técnica – Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. España: Acribia, Zaragoza. p. 288-291, 1988.

3.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus acidophilus* FRENTE A ESTIRPES PATOGÊNICAS INOCULADAS EM LEITE FERMENTADO

RESUMO

A crescente preocupação com a saúde e a qualidade de vida tornou a alimentação importante tema das pesquisas científicas, destacando-se o uso de probióticos pela indústria de laticínios. Uma das características que concerne aos probióticos é a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. No presente estudo, após a elaboração de leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* (LA5 Probiotic Culture Chr Hansen), foram analisadas as características físico química do produto e avaliada a viabilidade e ação antagonista da bactéria láctica frente ao crescimento de estirpes de *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *S. aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923) e *L. monocytogenes* (isolada de amostras de carne bovina - UFF) durante 35 dias de armazenamento sob refrigeração. O microrganismo probiótico testado foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*; e reduzir o ciclo logarítmico de *S. aureus*.

Palavras chave: Bactérias lácticas, probiótico, inibição, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *S. aureus*.

ABSTRACT

The increasing concern for health and quality of life has made food become an important issue in scientific research, highlighting the use of probiotic in dairy industries. One of the features of probiotics is the ability of inhibiting pathogenic microorganism growth. In this study, fermented milk was produced with *Lactobacillus acidophilus* (LA5 Probiotic Culture Chr Hansen), and product physicochemical characteristics were analyzed and viability and lactic bacteria antagonistic action were evaluated against the growth of strains of *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *S. aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923) and *L. monocytogenes* during 35 days of storage under refrigeration. Probiotic microorganism tested was able to inhibit the growth of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*; and to reduce log cycle of *S. aureus*.

Keywords: lactic bacteria, probiotic, inhibition, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *S. aureus*.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos alimentícios que promovem a saúde e o bem estar é uma das prioridades da pesquisa na indústria de alimentos e tem favorecido ao consumo de alimentos enriquecidos com componentes fisiologicamente ativos tais como os probióticos.

As culturas probióticas são suplementos microbianos viáveis, o que inclui bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado, que aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, além de contribuírem para melhorar as características sensoriais do produto final (BOOBIER et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; FRANCO et al., 2006; FULLER, 1989; REIS et al., 2007).

Os microrganismos probióticos mais empregados são os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; pertencentes a lista “Generally Recognized as Safe” (GRAS) do Codex Alimentarius (BIELECKA et al., 2002; BOYLSTON et al., 2004; KEMPKA, 2008; OLIVEIRA et al., 2002).

Os leites fermentados são definidos como produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade (BRASIL, 2007). Podem apresentar maiores níveis de aminoácidos livres e vitaminas em relação aos leites não fermentados (GOMES; MALCATA, 1999).

Os *Lactobacillus acidophilus* são bacilos em forma de bastão com as extremidades arredondadas, microaerófilos, homofermentadores, com temperatura ótima de crescimento a 45°C (VIEGAS, 2008). São considerados microrganismos com potencial probiótico, especialmente por resistirem a baixas tensões superficiais e ao suco gástrico, e pela facilidade em colonizar o intestino grosso (BATHIA et al., 1989; CHIODA et al., 2007; FERREIRA, 2001).

Os microrganismos utilizados como probióticos devem ser seguros quanto ao uso e apresentar determinadas características como capacidade de sobreviver e colonizar o intestino, manter viabilidade e atividade no alimento carreador durante distribuição e armazenamento, competir por sítios de ligação e sintetizar substâncias que levem ao antagonismo do crescimento de patógenos; beneficiando o equilíbrio microbiano intestinal e produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor (DE MARTINIS et al.,

2003; HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; OLIVEIRA et al., 2002; PEREIRA; GOMÉZ, 2007; SAARELLA et al., 2000).

As substâncias antagônicas produzidas por bactérias lácticas probióticas correspondem a metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e especialmente bacteriocinas; que constituem proteínas e peptídeos com atividade antibacteriana (ALEXANDRE et al., 2002; DANIEL et al., 2006; GUERRA; BERNADO, 2005; JACK et al., 1995; MARTINEZ et al. 2003; MARTINIS et al., 2003).

Dentre os benefícios atribuídos ao uso de probióticos, destacam-se o controle das infecções intestinais, o estímulo da motilidade intestinal, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização da lactose, a redução dos níveis de colesterol, o efeito anticarcinogênico e o estímulo do sistema imunológico contra patógenos no intestino e em outros tecidos (OLIVEIRA et al., 2002).

A inocuidade dos alimentos constitui assunto de relevância tanto para indústria quanto para Saúde Coletiva, visto que enfermidades podem ser transmitidas pela ingestão de alimentos contaminados por patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Sataphylococcus aureus*.

Diversas estirpes de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e animais, destacando-se a *E. coli* O157:H7, implicada como agente etiológico da colite hemorrágica e da síndrome urêmica hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A *Listeria monocytogenes* é um microrganismo causador de doença alimentar atípica de alta gravidade, alta mortalidade, longo período de incubação e prevalência particular em indivíduos imunocomprometidos, idosos, crianças, recém-nascidos e gestantes; podendo acometer o sistema nervoso central (GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005; LOGUERCIO et al., 2001; MCLAUCHLIN et al., 2004; MENA et al., 2004).

S. aureus está mais relacionado com casos e surtos de intoxicação pela habilidade de sintetizarem enterotoxinas nos alimentos, que estimulam a proliferação não-específica de células T, ocasionando quadros de gastroenterites em período de incubação médio de uma a oito horas (DINGES et al., 2000; HAJDENWURCEL, 2004).

O leite e derivados são frequentemente incriminados em enfermidades transmitidas por alimentos, fato que induziu ao desenvolvimento da presente pesquisa, objetivando a elaboração de leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e verificar a

viabilidade e ação antagonista frente a estirpes de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* durante o período de armazenamento do produto sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração do leite fermentado foi realizada, seguindo as boas práticas de fabricação, no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF); Niterói/RJ. A matéria prima e o produto final foram avaliados quanto a qualidade microbiológica e físico química nos Laboratórios de Controle Microbiológico e de Físico-Químico de Produtos de Origem Animal da UFF.

Elaboraram-se 25 litros de leite fermentado em tanque de ácido inoxidável, previamente higienizado, utilizando-se leite UHT integral como matéria-prima. O leite UHT foi avaliado quanto a qualidade bacteriológica através da contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa de *S. aureus* e pesquisa de *E. coli* empregando-se o teste rápido Rida[®], seguindo a metodologia do fabricante. Realizou-se também, em triplicata, a pesquisa de resíduos de antimicrobianos com o teste Eclipse (CAP-LAB), mensurou-se o pH e a acidez, com peagômetro e pelo método de Dornic respectivamente, e a crioscopia com auxílio de crioscópio eletrônico (MC5400) (BRASIL, 2006).

As análises bacteriológicas realizadas no leite UHT apresentaram resultados satisfatórios, visto que não houve crescimento de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli*. A pesquisa de presença de resíduos de antimicrobianos foi negativa, os valores da crioscopia correspondente a $-0,55^{\circ}\text{H}$, do pH a 6,5 e da acidez a 18°Dornic ($^{\circ}\text{D}$); atendendo aos padrões determinados no regulamento técnico do produto, confirmando a qualidade desejável da matéria prima (BRASIL, 1997).

A cultura láctica utilizada foi o *Lactobacillus acidophilus* (LA5 Probiotic Culture Chr Hansen) adicionado diretamente aos 25 L de leite no tanque, na proporção de 25g de cultura para 250L de leite. Após a homogeneização o produto foi envasado em garrafas plásticas tipo “pet” (Emballi[®]) de 250 mL, previamente esterilizadas em

autoclave a 121°C/15 min, e incubado em estufa à temperatura de 45°C para promover o processo de fermentação.

A princípio a acidez do produto foi mensurada de hora em hora pelo método de Dornic e com auxílio de peagômetro, seguindo a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006). Após alcançar a acidez desejada, as garrafas foram retiradas da estufa e separadas em grupos experimentais: amostras controle (25 garrafas), contendo apenas o inóculo da cultura láctica probiótica, e amostras indicadoras inoculadas com as estirpes patogênicas.

As estirpes patogênicas utilizadas como culturas indicadoras foram *E. coli* O157:H7 (E 40705-SH1 Public Health Laboratory Science), *Staphylococcus aureus* (culti loops lot 604736 ATCC25923) e *Listeria monocytogenes* (isolada de amostras de carne bovina – UFF). Os microrganismos foram previamente semeados para ativação em ágar Nutriente e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Todas as culturas antes de serem inoculadas foram avaliadas quanto a morfologia bacteriana em microscópio de imersão, após confecção de esfregaços em lâminas e coloração pelo método de Gram.

As culturas indicadoras foram transferidas para solução salina esterilizada com auxílio de alça de platina até que a concentração alcançasse a escala 1,0 de MacFarland. Inoculou-se suspensão de um mililitro de cada estirpe, separadamente pós-fermentação, em 250 mL de leite fermentado, totalizando 25 garrafas do produto para cada microrganismo patogênico indicador.

A amostra controle foi analisada em triplicata quanto ao teor de gordura pelo método de Gerber e ao teor de proteína pelo método de Kjeldahl, de acordo com metodologia preconizada na Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006).

As amostras controle e indicadoras foram armazenadas em refrigeração a 5°C durante um período de 35 dias para realização das análises microbiológicas e avaliação da acidez nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 23, 25, 28, 30 e 35.

O pH e a acidez titulável foram mensurados nas amostras controles, nos dias de armazenamento determinados. O pH foi medido com auxílio de peagômetro Quimis (Modelo Q400HM) em 10 mL de amostra retirados das garrafas. O eletrodo do pH foi calibrado com solução tampão (Merck®) de pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável foi monitorada pesando-se 10 mg da amostra e adicionando-se 10 mL de água destilada aquecida isenta de gás carbônico (60°C). Após homogeneização, adicionou-se à

amostra cinco gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com solução 0,1 N de NaOH até que a cor apresentasse tom levemente rósea persistente por aproximadamente 30 segundos (BRASIL, 2006). A quantidade de NaOH em mL foi registrada e convertida em gramas de ácido láctico.

As análises bacteriológicas foram realizadas nas amostras controle e indicadoras nos dias de armazenamento determinados, procedendo-se previamente as diluições seriadas em solução salina peptonada 0,1% até 10^{12} .

Nas amostras controle foi realizado a contagem de bactérias ácido lácticas em ágar Man Rugosa Shape (MRS; Acumedia 7543A) por semeadura em profundidade. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose (Anaerobac) em estufa bacteriológica a 37°C por 72 horas. Após incubação selecionaram-se as placas que apresentaram UFC brancas e leitosas, circulares e com bordas perfeitas.

Foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro e corados pelo método de Gram para observação em microscopia das características morfotintoriais das UFC, assim como realizada a prova da catalase com adição às placas de peróxido de hidrogênio 10%. Os cultivos apresentaram prova da catalase negativa e presença de bastonetes Gram positivos, sendo confirmados como *Lactobacillus acidophilus*.

Nas amostras indicadoras as contagens foram realizadas após semeadura em profundidade de 1 mL de cada amostra de *E. coli* O157 em ágar Mac Conckey Sorbitol (Acumedia 7320A) e *Listeria monocytogenes* em *Listeria* Agar Selectivo Oxford (Merck 7004). Das amostras inoculadas com *S. aureus* foram coletados 0,1mL para semeadura por espalhamento em superfície no meio de cultura ágar Baird Parker (Merck 5406). As placas semeadas foram incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados correspondem a média das contagens. Os dados bacteriológicos foram convertidos para log UFC/mL e avaliados estatisticamente através da análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação do produto teve duração de 24 horas, quando o leite fermentado atingiu valores de pH e acidez titulável correspondentes a 4,57 e a 0,8 gramas de ácido láctico/100mL respectivamente, em conformidade com o especificado pela legislação

(BRASIL, 2007). O processo fermentativo longo é explicado pelo lento crescimento do *L. acidophilus*, que requer grande quantidade de nutrientes, devendo ser utilizado maior concentração de inóculo (2-5%) (FERREIRA, 2001).

Após o período de fermentação e estocagem, os teores de proteína e gordura do produto final foram respectivamente 3,4% e 3,2%, correspondendo aos padrões de identidade e qualidade do produto estabelecidos no regulamento vigente (BRASIL, 2007).

No decorrer do período de 35 dias de armazenamento, sob refrigeração a 5°C, houve redução do pH com conseqüente aumento da acidez do produto, como observado nos gráficos representados na Figuras 1 e 2. O pH final do produto foi de 4,34 e a acidez titulável de 1,01 gramas de ácido láctico/100mL de amostra, em conformidade com os valores de acidez de no mínimo 0,6g de ácido láctico/100g do produto e no máximo 2,0g de ácido láctico/100g do produto preconizados pela legislação (BRASIL, 2007).

A alteração observada com relação ao pH e acidez do leite fermentado, provavelmente, foi devido ao metabolismo do *Lactobacillus acidophilus*, que a partir da fermentação da lactose ocasionou a formação de ácido láctico; visto que é considerado um microrganismo homofermentador conforme descrição de Viegas, 2008. Essa característica do leite fermentado acidófilo é um fator que favorece a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis, como as bactérias deteriorantes e patogênicas.

Valores de pH similares aos encontrados no presente trabalho foram observados por Soave e Lacerda (2007) que ao analisarem bebidas lácteas elaboradas com culturas probióticas obtiveram amostras variando de 4,5 a 5,0; acidificação reduzida comparada a produzida no produto fermentado sem probiótico. Dados semelhantes também foram encontrados por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) como pH 4,63 e acidez titulável 78,9° D; e por Oliveira e Damin (2003) que ao prepararem leite fermentado com *S. thermophilus* e *L. acidophilus* observaram pH variando de 4,03 a 4,43 e acidez de 75,19 a 111,91°D durante estocagem por sete dias.

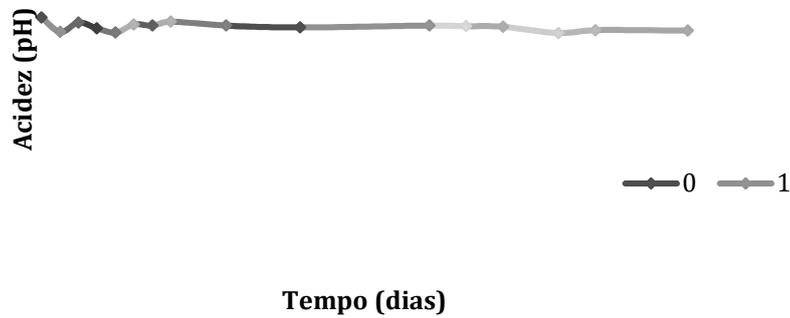


Figura 1 Resultados da acidez (pH) durante 24 horas de fermentação do leite fermentado por *L. acidophilus*.

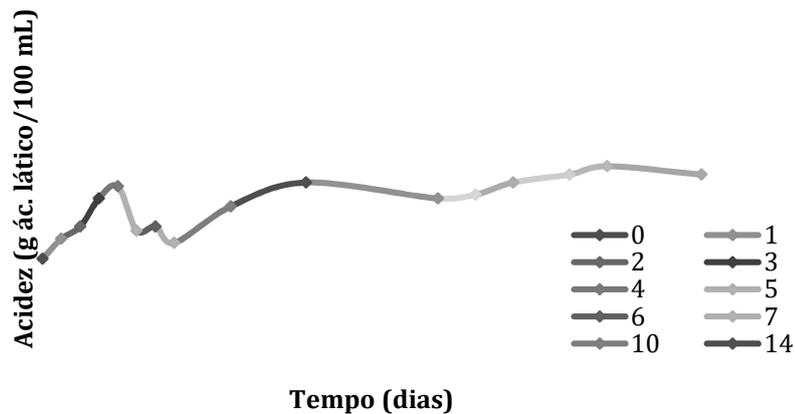


Figura 2 Resultados da acidez titulável (gramas de ácido láctico/100 mL) durante 24 horas de fermentação do leite por *L. acidophilus*.

Corroboram-se a faixa de pH e acidez encontrada neste trabalho com os resultados de Faria et al. (2006) que ao elaborarem leite fermentado com leite de búfala e probiótico, apesar de utilizarem uma espécie diferente de *Latobacillus*, obtiveram para o tempo de fermentação de 24 horas, produto com pH final, após 30 dias de estocagem, variando de 4,45 a 4,34 e acidez titulável de 1,16 a 1,26 g de ácido láctico.

Outros pesquisadores ao estudarem a acidificação nos produtos derivados de leite também encontraram resultados semelhantes, como Victal e Knight (2009) que prepararam bebida láctea com cultura probiótica e verificaram a variação de pH de 4,16 a 4,69 e acidez de 61 a 126 °D durante 30 dias armazenamento.

O processo de acidificação estudado na presente pesquisa é considerado na literatura como menos intenso, comparado ao do leite fermentado utilizando culturas sem microrganismos probióticos. Esse fato deve-se a menor produção de ácido láctico em relação aos tratamentos utilizando cultura tradicional, em função dos probióticos se caracterizarem pela baixa capacidade de acidificação; o que favorece o sabor final do produto (LACERDA et al, 2007; THAMER; PENNA, 2005; VICTAL; KNIGHT, 2009).

A variação, de acidez e de pH, observada durante o período de armazenamento do leite fermentado elaborado neste experimento, não foi prejudicial à viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* que foi mantido acima do limite mínimo aceitável.

A relação entre contagens de células bacterianas (Y) e tempo de armazenamento (X) do leite fermentado acidófilo foi estudada através da análise de regressão sugerindo a formação de uma reta no gráfico, sendo avaliada pelas equações lineares representadas na Tabela 1.

A população inicial de *Lactobacillus acidophilus* foi de 13,4 log UFC/mL do produto. Durante o período de 35 dias de estocagem ocorreu uma leve redução na concentração bacteriana para 11,6 log UFC/mL, representada no gráfico da Figura 3, o que não influenciou na característica final do produto, uma vez que as contagens foram superiores ao valor preconizado na legislação correspondente a 10^7 UFC/g de alimento, constante em Brasil 2007. Os resultados encontrados são indicativos da manutenção da viabilidade da cultura probiótica utilizada na elaboração do leite fermentado durante todo o prazo de estocagem, atendendo a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas pela ANVISA, que especifica como quantidade mínima viável para os probióticos a faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo conforme indicação do fabricante; contudo valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a eficácia (BRASIL,2008).

AMOSTRA	MODELO DE EQUAÇÃO	R^2	Pi>F
---------	-------------------	-------	------

C	Y=13,43-0,13X	0,81	0,0001
I1	Y=9,25-0,04X	0,91	0,0001
I2	Y=7,92-0,02X	0,79	0,0001
I3	Y=9,13-0,04X	0,89	0,0001

Tabela 1 Equação Linear de Regressão. C= amostra controle (*L.acidophilus*); I1= Amostra Indicadora 1 (*E. coli* O157:H7); I2= Amostra Indicadora 2 (*S. aureus*); I3= Amostra Indicadora 3 (*L. monocytogenes*).

Y= contagem de células bacterianas

X= tempo em dias de armazenamento do iogurte

De maneira similar, a viabilidade de *L. acidophilus* durante a estocagem foi observada por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) que obtiveram contagem bacteriana de $2,1 \times 10^8$ UFC/mL; Wang et al. (1994) verificaram contagens de 1,84 a $8,20 \times 10^8$ UFC/mL e Thamer e Penna (2005) determinaram $1,15 \times 10^8$ a $2,55 \times 10^{12}$ UFC/mL. Entretanto, Barreto et al (2003) ao avaliar os leites fermentados com *L. acidophilus* comercializados no Brasil verificaram contagens variando de 6,66 a 8,60 log UFC/g de produto.

Cunha et al (2009) encontraram valores para contagem de bactérias probióticas inferiores aos obtidos na presente pesquisa, correspondentes a $1,7 \times 10^6$ - $9,8 \times 10^6$ UFC/g durante 28 dias de estocagem e concluíram que a variação foi dependente da matéria prima utilizada na elaboração do leite fermentado e não do tempo de armazenamento a 5°C.

Por sua vez, Gonçalves e Eberle (2008) deduziram que a acidificação do produto final, os ácidos produzidos durante o armazenamento, o nível de oxigênio no produto e a permeação do oxigênio através da embalagem podem reduzir a viabilidade das culturas probióticas.

As contagens iniciais das amostras indicadoras (*E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes*) foram 8,4 log UFC/mL, e decresceram muito lentamente durante o período de armazenamento. Analisando a Figura 3, correspondente a curva de crescimento bacteriano, observa-se que *Escherichia coli* (I1) não foi mais detectável no produto a partir do vigésimo quinto dia de estocagem, quando ocorreu morte celular, provavelmente por exclusão competitiva por nutrientes ou pela ação de ácidos orgânicos e substâncias antagônicas.

A *Listeria monocytogenes* (I3) manteve viabilidade até o vigésimo oitavo dia, a partir do qual não foi mais detectada, indicando ter ocorrido lise celular, provavelmente pelos mesmos fatores supracitados.

S. aureus (I2) foi reduzido em cinco ciclos logarítmicos para 3,2 log UFC/mL, entretanto manteve-se viável durante o período de armazenamento.

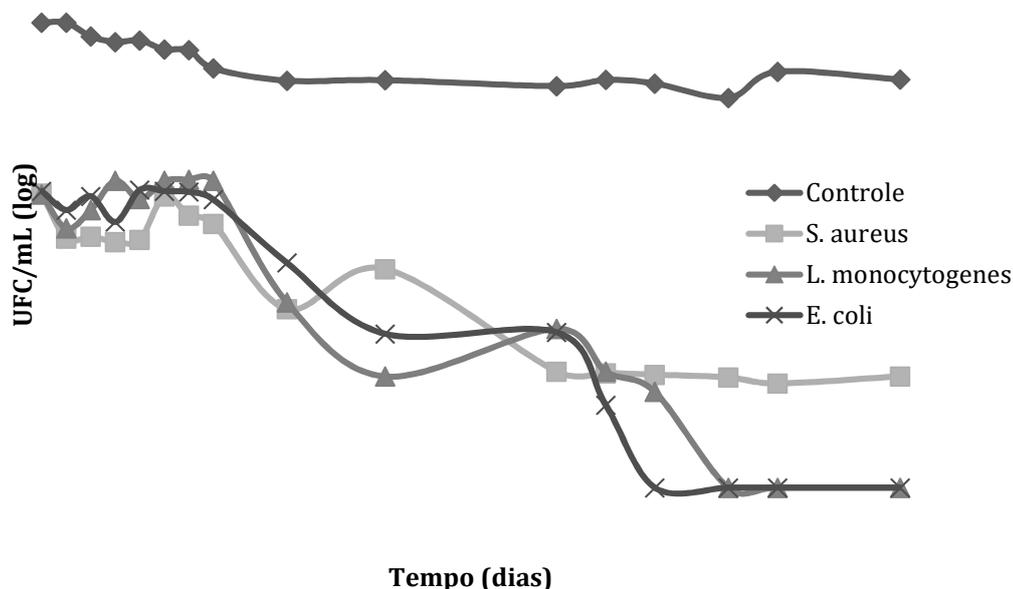


Figura 3 Resultado das contagens bacteriológicas, em UFC/mL, nas amostras controle (C= *L. acidophilus*); e nas amostras indicadoras de *E. coli* O157:H7 (I1); *S. aureus* (I2); e *L. monocytogenes* (I3), do leite fermentado armazenado a 5°C por 35 dias.

A inibição ou redução do crescimento de microrganismos patogênicos observada nesta pesquisa é induzida pela própria atividade metabólica da cultura probiótica que além de contribuir para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis no produto e aumentar o valor nutritivo, propicia a conservação interferindo na multiplicação de bactérias por competição direta por nutrientes e pela produção de compostos antagônicos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (ALEXANDRE et al., 2002; FERNANDES et al., 2008; FONTES et al., 2005; GUERRA; BERNADO, 2005; MARTINEZ et al. 2003; MARTINIS et al., 2003). Similarmente, Barrantes et al. (2004) avaliaram a atividade antagonista de culturas probióticas, *L. acidophilus* e *L. casei*, adicionadas em iogurtes inoculados com *L. monocytogenes* e *E. coli*. Os pesquisadores também observaram a eficiência dos probióticos que permaneceram com contagens de 10⁸ UFC/g e proporcionaram a

inibição de *L. monocytogenes* após o oitavo dia de armazenamento e *Escherichia coli* no décimo sexto dia.

Apesar da similaridade dos resultados desta pesquisa com os dados obtidos em literatura, Victal e Knight (2009) observaram a inibição de *E. coli* pelo microrganismo probiótico em menor período de tempo; assim como Calderón et al. (2007) que verificaram a ação inibitória do *L. acidophilus* adicionado a iogurte sobre *L. monocytogenes* a partir do décimo segundo dia e *E. coli* após o oitavo dia de armazenamento.

Entretanto o resultado, referente à manutenção da viabilidade das estirpes de *S. aureus* neste trabalho, difere do achado por Calderón et al (2007) que registraram o desaparecimento do microrganismo patogênico a partir do décimo segundo dia de estocagem sob refrigeração. Souza (2006) estudou a evolução das bactérias *Staphylococcus* spp. e coliformes totais em queijo minas frescal adicionado de *L. acidophilus* e também verificou que ocorreu inibição dos microrganismos contaminantes pela ação da cultura probiótica; diferente do resultado desta pesquisa na qual não foi observada a inibição de *S. aureus*.

A atividade antagonista do *L. acidophilus* também foi demonstrada por outros pesquisadores que trabalharam com elaboração de queijos, no entanto, igualmente aos dados do presente experimento, Chioda et al (2006) averiguaram total inibição de *L. monocytogenes*, mas em 10 dias de armazenamento. Por sua vez, Alves (2010) verificou apenas a redução de três ciclos logarítmicos no crescimento de *E. coli* ao longo de 30 dias de armazenamento de queijo minas frescal, resultado diferente do encontrado neste trabalho onde houve inibição total do microrganismo no vigésimo quinto dia de armazenamento.

A ação antagonista do probiótico usado neste experimento foi confirmada na literatura por autores que adotaram técnicas *in vitro* para observação de halos de inibição frente a *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (CHIODA et al, 2007; GARCIA et al, 2006; GUEDES NETO et al, 2005; PEREIRA; GOMÉZ, 2007).

A capacidade antagonista do *L. acidophilus* estudado nesta pesquisa foi avaliada por Brizuela et al. (2001) que analisaram *in vitro* características como velocidade específica de crescimento, tempo de geração, e resistência a ácido, bile e substâncias antimicrobianas; determinando o grande potencial probiótico do microrganismo.

Contudo, Bielecka et al (2002) ressaltaram que o efeito de uma bactéria é específico para cada estirpe, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras estirpes da mesma espécie.

Além disso, determinados fatores podem influenciar na eficiência da ação inibitória dos microrganismos probióticos como o estágio de contaminação, a dose do inóculo contaminante, o tipo de cepa, a resistência a ácido, a quantidade e o tipo de bactéria ácido láctica utilizada; associados ainda ao conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento, que constituem os obstáculos tecnológicos ao crescimento microbiano (FRANCO; LANDGRAF, 2005; HSIN-Y; CHOU, 2001; KASIMOGLU; AKGÜN, 2004; MUFANDAEDZA et al., 2006). Os fatores pontuados, possivelmente constituem a causa da manutenção da população de *S. aureus* no leite fermentado elaborado neste experimento e armazenado sob refrigeração.

CONCLUSÃO

O *Lactobacillus acidophilus* utilizado na elaboração do leite fermentado manteve-se viável durante o período de armazenamento, apresentou ação antagonista total no desenvolvimento de estirpes de *E. coli* e de *L. monocytogenes*, e inibiu parcialmente *S. aureus*; conferindo desta forma características probióticas ao produto final. Entretanto para que a efetividade da cultura probiótica seja garantida, a interação entre determinados fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento, que influenciam no crescimento e metabolismo microbiano, deve ser considerada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

ALVES, C.C.C. *Comportamento da Escherichia coli em queijo minas frescal elaborado com utilização de Lactobacillus acidophilus e de acidificação direta com ácido láctico*. Niterói, 2010, 80 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de POA) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de

Listeria monocytogenes y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v.54, n.3, sep. 2004.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D.K.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.6, n.1, p.119-126, jan./jun. 2003.

BATHIA, S.J.; KOCHAR, N.; ABRAHAM, P.; NAIR, N.G.; MEHTA, A.P. *Lactobacillus acidophilus* Inhibits Growth of *Campylobacter pylori* In Vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, v.27, n. 10, p.2328-2330, out. 1989.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.B.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, Toronto: Elsevier, Canadian Institute of Food Science and Technology, v.35, n.2/3, p.125-131. 2002.

BOOBIER, W. J.; BAKER, J. S.; DAVIES, B. Development of a healthy biscuit: an alternative approach to biscuit manufacture. *Nutrition Journal*, London, v.5, n.7, p. 1-7. 2006.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, Elsevier, v.14, n.5, p.375-387, mai. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. *Diário Oficial da União*. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Brasília. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 8, 12 de dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 de out. 2007. Seção 1, pt. 5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. *Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos*. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 25 jan. 2008.

BRIZUELA, M.A.; SERRANO, P.; PEREZ, Y. Studies on Probiotics Properties of Two *Lactobacillus* Strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Curitiba: Tecpar, v.44, n.1, mar, 2001.

CALDERON, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas, v.57, n.1, mar. 2007.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.101, n.557-558, p.121-124. 2006.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F.. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

CUNHA, T.M.; ILHA, E.C.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRETO, P.L.M.; CASTRO, F.P.; PRUDÊNCIO, E.S. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v. 12, n. 1, p. 23-33, jan./mar. 2009.

DANIEL, C.; POIRET,S.; GOUDERCOURT,D.; DENNIN, V.; LEYER,G.; POT,B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.72, n.9, p. 5799–5805, set. 2006.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M.. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, Taylor & Francis, v.18, p. 191-208. 2002.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology, v. 13, n. 1, p. 16-34, jan. 2000.

FARIA, C. P.; BENEDET, H.D.; LE GUERROUE, J.L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.41, n.3, mar., p.511-516. 2006.

FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

FERREIRA, C.L.L.F. *Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos*. 2 ed. UFV. Viçosa. 2001. 112p.

FONTES, E.A.F.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A. Método Alternativo para Enumeração de Bactérias Lácticas. In: *Anais Eletrônicos do XXII Congresso Nacional de Laticínios*. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora, 18 a 21 de julho, 2005.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. Wiley Blackwell, Oxford, v. 66, n.5, p. 365-378, 1989.

GARCIA,G.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MEDEIROS, A.P.; POIATTI, M.L.; RAGAZANI, A.V.F.; HATAYDE, M.C.; CHIODA, T.P.; COAN, R.M.; PIGATTO, C.P.; TROVÓ, K.V.P. Inibição do Crescimento de Bactérias Patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 101, n.559-560, p.263-268. 2006.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela. 2001. 629 p.

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

GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Frozen yogurt with probiotic bacteria. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Araraquara, v.19, n.3, p. 291-297, jul./set. 2008.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

GUERRA, M.M; BERNARDO, F.M.A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria spp.* em queijos tradicionais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.100, n.555-556, p.185-188. 2005.

HAJDENWURCEL, J.R. *Atlas de Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2004, v.1. 66p.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, Canadian Institute of Food Science and Technology: Elsevier, v. 35, n. 2, p.109-116. 2002.

HSIN-YI, C.; CHOU, C-C. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiolgy*. v.70, n.1-2, p.189-195, out. 2001.

JACK, R.W; TAGG, J.R; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Review*. American Society by microbiology, v. 59, p. 171-200, 1995.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KASIMOGLU, A.; AKGÜN, S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. *International Journal of Food Science & Technology*. Wiley, v.39, n.5, p.563-568, mai. 2004.

KEMPKA, A.P; KRUGER, R.L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHER, H.; CANSIAN, R., OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.0, p. 170-177, dez. 2008.

LACERDA, T.M.; KOBAYASI, M.S.; ALCARDE, V.E. Preparação de bebidas lácteas empregando fermentação contínua e descontínua, utilizando como substrato diferentes concentrações de soro e queijo e otimização dos dados de fermentação. In: *15º Congresso de Pesquisa. 5º amostra Acadêmica UNIMEP*. Piracicaba, 22-25 de outubro de 2007.

LOGUÉRCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan/fev. 2001.

MARTINEZ, B.E.G.; TREVIÑO, M.G.; SALAS, Z.S. Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, v.4, n.2, abr/jun. 2003.
Disponível : <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
Acesso em: dez 2005.

MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MCLAUCHILIN, J.; MITCELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 92, n. 1, p. 15-33, abr. 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. Elsevier, v. 21, n. 2, p. 213-216, abr. 2004.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B.C.; FERESU, S.B.; GADAGA, T.H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.108, n.1, p.147-152, abr. 2006.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, p.172-176, dec. 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo, v. 38, n. 1, jan./mar., p.1-21, 2002.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

REIS, A.R.N.; GOULART, P.F.P.G; SILVEIRA, I.A. Elaboração de Bebida Simbiótica e Avaliação de sua Qualidade Sensorial e Microbiológica. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.21, n.151, p. 31-36, maio. 2007.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. Elsevier, v. 84, n. 3, p. 197-215, dez. 2000.

SOAVE, P.B.; LACERDA, THM. Acompanhamento da Vida Útil de Bebidas Lácteas: Influência do Soro do Queijo e Culturas Contendo Organismos Probióticos. In: *15º Congresso de Iniciação Científica*. V Amostra Acadêmica UNIMEP. Piracicaba, out, 2007, p.1-9.

SOUZA, C.H.B. *Influência de uma Cultura "Starter" Termofílica sobre a viabilidade de Lactobacillus acidophilus e as características de queijo minas frescal probiótico*. São Paulo, 2006, 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

TAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e defrutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo, v. 41, n.03, p.393-400, jul./set., 2005.

VICTAL, C.L.; KNIGHT, I.C.S. *Avaliação da Vida Útil de Bebidas Lácteas Fermentadas Obtidas por Fermentação Contínua e Descontínua*.

Disponível em:

<http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/4mostra/pdfs/108.pdf>

Acesso em: maio 2009.

VIEGAS, R.P. *Leites Fermentados Probióticos Produzidos a Partir de Bactérias Ácido Lácticas e Adicionados de Concentrado Protéico de Soro Lácteo: Características Físico-Químicas, Microbiológicas e Sensoriais*. Belo Horizonte, 2008, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, 2008.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v.24, n.4, oct/dec. 2004.

WANG, S.H.; MARIMHO, C.S; CARVALHO, E.P. Produção de logurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v.29, n.10, p.1593-1601,out.1994.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na avaliação da ação antagonista de bactérias lácticas tradicionais, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, e o microrganismo probiótico, *Lactobacillus acidophilus*, observou-se que:

- As culturas láctica e probiótica apresentaram *in vitro* ação inibitória frente aos patógenos *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, entretanto não inibiram 100% das estirpes patogênicas testadas.
- Na verificação da atividade inibitória diretamente nos leites fermentados elaborados e inoculados com os patógenos durante os 35 dias de armazenamento sob refrigeração, o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* foram capazes de inibir o desenvolvimento de *E. coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, mas apenas reduziram em cinco ciclos logarítmicos o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Por sua vez, o *Lactobacillus acidophilus* inativou a população de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* e diminuiu em cinco ciclos logarítmicos o crescimento de *S. aureus*.
- Na estocagem por 35 dias sob refrigeração, a cultura láctica e a probiótica mantiveram a viabilidade desejada e os leites fermentados atenderam aos padrões de identidade quanto a acidez e aos teores de proteína e de gordura.

A ação antagonista é dependente da manutenção da viabilidade dos microrganismos lácticos no produto até o momento do consumo, em quantidades suficientes para o exercício das funções desejadas e exigidas pela legislação, o que foi observado neste experimento. Entretanto, outros fatores intrínsecos e extrínsecos

ao alimento podem ter exercido influência no mecanismo de ação das culturas lácticas, justificando a variação nos resultados obtidos nesta pesquisa.

A bioconservação proporcionada pelas bactérias lácticas e probióticas pode ser influenciada por um conjunto de fatores, que devem ser estudados para cada estirpe selecionada e cada produto a ser elaborado, visto que as características são específicas. Além disso, a fim de garantir a segurança e eficácia dos alimentos fermentados, ressalta-se que as substâncias antimicrobianas dificilmente poderão substituir as boas práticas de fabricação, sendo primordial a adoção de programas de controle de qualidade para reduzir as chances de contaminação no produto.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. *Mercado Brasileiro dos alimentos industrializados*. 2005.

Disponível em: via WWW.URL: http://www.anuarioabia.com.br/editorial_05.htm
Acesso em: 06/2007.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

ALVES, F.F. et al. Leite Fermentado Probiótico Tipo Sundaie contendo *Lactobacillus acidophilus*. In: XXII Congresso Nacional de Laticínios, 18-21 jul, 2005, Juiz de Fora. *Anais Eletrônicos: A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos*. Juiz de Fora, 2005.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes Desnatados Probióticos Adicionados de Concentrado Protéico do Soro de Leite: Perfil de Textura, Sinérese e Análise Sensorial. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of food and Nutrition*, Araraquara, v.15, n. 2, p. 107-114. 2004.

BADARÓ, A.C.L.; et al. Probióticos: Aplicações como Promotores na Saúde Humana. *Nutrir Gerais. Revista Digital de Nutrição*. Ipatinga: Unileste- MG, parte 2, v.3, p.396-416, fev./jul. 2009.

Disponível em:

http://www.unilestemg.br/nutrirgerais/downloads/artigos/volume3/artigo_5_rng_alimentos_probioticos.pdf

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A.S.; HAULY, M.C.O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v.19, n.3, sept./dec. 1999.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v.54, n.3, sep. 2004.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D.K.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e

Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.6, n.1, p.119-126, jan./jun. 2003.

BATHIA, S.J.; KOCHAR, N.; ABRAHAM, P.; NAIR, N.G.; MEHTA, A.P. *Lactobacillus acidophilus* Inhibits Growth of *Campylobacter pylori* In Vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, v.27, n. 10, p.2328-2330, out. 1989.

BEHMER, M.L.A. *Tecnologia do leite - Produção, Industrialização e Análise*. São Paulo: Nobel, 1999. 321p.

BEDANI, R. *Influência do Consumo de "iogurte" de Soja Fermentado Com Enterococcus faecium CRL 183 na Microbiota Intestinal de Animais e Humanos*. Araraquara, 2008. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2008.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.B.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, Toronto: Elsevier, Canadian Institute of Food Science and Technology, v.35, n.2/3, p.125-131. 2002.

BISCAIA, I.M.F.; STADLER, C.C.; PILATTI, L.A. *Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas*. In: XI SIMPEP, 08 a 10 de novembro de 2004, São Paulo: Bauru.

Disponível em: www.pg.cefetpr.br/ppgep/Ebook/ARTIGOS.

Acesso em: nov. 2008.

BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. *Trends in Food Science & Technology*, European Federation of Food Science and Technology: Elsevier, v.13, p.372-379. 2002.

BOOBIER, W. J.; BAKER, J. S.; DAVIES, B. Development of a healthy biscuit: an alternative approach to biscuit manufacture. *Nutrition Journal*, London, v.5, n.7, p. 1-7. 2006.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y.. *Staphylococcus* Enterotoxigênicos em Leite e Produtos Lácteos, suas Enterotoxinas e Genes Associados: Revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

BORGES, M.F.; ANDRADE, A.P.C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. *Listeria monocytogenes em Leite e Produtos Lácteos*, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 119, jun., 2009. 31p.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, Elsevier, v.14, n.5, p.375-387, mai. 2004.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. *Indústria de Laticínios*, São Paulo, v.6, n.37, p. 64-66, jan./fev. 2002.

BRANDÃO, W.A.P.L.N.T.M. *Elaboração de Bebida Fermentada Simbiótica de Soro Lácteo*. Florianópolis, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 07/07/1952, revisado em 08/07/2008. Seção 1. 2008a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 8, 12 de dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 de out. 2007. Seção 1, pt. 5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. 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*, Brasília, DF, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Portaria nº19, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 de maio de 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos*. 2008b.

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm
Acessado em: 03-02-08.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº2, de 7 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*, 09/01/2002. Republicada no Diário Oficial da União, 17/07/2002.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da Bacteriocina Produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu Efeito sobre *Listeria monocytogenes* em Carne Bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n.1, p. 135-144. 2006.

BRAZAL GARCIA, T., RUIZ-ATIENA RUIZ, L., ESPEJO DIAZ, M. Microbiological quality of natural and flavoured yoghurts, consumed in Alicante Province. *Alimentaria*, Madrid, v. 177, n.29, p. 39-42, set./out. 1986.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Publicación Oficial de La sociedad Latinoamericana de Nutrición*, México, v.57, n.4, 2007.

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*. Wiley Blackwell, v. 50, n.1, p. 21-27. 1997.

CALDERON, O; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas, v.57, n.1, mar. 2007.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.50, p. 131-149. 1999.

CARR, F.J.; CHILL, D; MAIDA, N. The lactic Acid Bacteria: A Literature. *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis Group, v. 28, n. 4, p. 281-370. 2002.

CHANDAN, R.; SHAHANI, K.M. Yogurt. In: HUI, Y.H. *Dairy Science and Technology Handbook*. Product Manufacturing. E.U.A.: Wiley-VCH, v.2, cap.1, p.1-56. 1993.

CHESCA, A.C.; CASTRO, H.K.; SILVEIRA, M.; D'ANGELIS, C.E.M. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Queijos de Baixa Umidade Frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.23, n.174/175, p.123-128, jul/ago. 2009.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.101, n.557-558, p.121-124. 2006.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F.. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Wiley Blackwell, v. 5, p. 52-64. 2006.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.71, p.1-20, dec. 2001.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk*. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, 1990. 301p., v. 1. p.77-114.

COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e Resposta Imune. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.34, n.4, july/aug. 2004.

DAESCHEL, M. A . Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. Washington, v. 43, p. 164 -167. 1989.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. E.; HARTMAN, D. E. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, v.171, n.4, p. 2188-2194, abr. 1989.

DANIEL, C.; POIRET,S.; GOUDERCOURT,D.; DENNIN, V.; LEYER,G.; POT,B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.72, n.9, p. 5799–5805, set. 2006.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. *Bioconservação de alimentos: Aplicação de Bactérias Lácticas e suas Bacteriocinas para a Garantia da Segurança Microbiológica de Alimentos*. Mai 2003.

Disponível em: www.alertamedico.com.br

Acesso em: out. 2009.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M.. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, Taylor & Francis, v.18, p. 191-208. 2002.

DELBONI, R.R. *Dinâmica Populacional de Microrganismos e a Conservação de Alimentos*. Campinas, 2009, 132f. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada) - Instituto de Matemática Estatística e Computação Científica. Matemática Aplicada, UNICAMP. Campinas/SP. 2009.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology, v. 13, n. 1, p. 16-34, jan. 2000.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J. R. *Foodborne disease handbook*. 2 ed. New York: M. Dekker, v. 1, cap. 10, p. 213-246. 2001.

ESTRADA, A.Z.; MENDOZA, R.S.; LA GARZA, L.M.; FERADO, J.O. Behavior of enterotoxigenicstrains of *Staphylococcus aureus* in milk fermented with a yogurt starter

culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Asociación Latinoamericana de Microbiología. v. 42, p. 5-10, 1999.

FARIA, C. P.; BENEDET, H.D.; LE GUERROUE, J.L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.41, n.3, mar., p.511-516. 2006.

FERNANDES, C.E.; BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

FERREIRA, C.L.L.F. *Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos*. 2 ed. UFV. Viçosa. 2001. 112p.

FERREIRA, C.L.F. *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. Viçosa Suprema Gráfica e Editora. 2003. 97p.

FONTES, E.A.F.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A. Método Alternativo para Enumeração de Bactérias Lácticas. In: *Anais Eletrônicos do XXII Congresso Nacional de Laticínios*. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora, 18 a 21 de julho, 2005.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu. 2005. 182p.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. Wiley Blackwell, Oxford, v. 66, n.5, p. 365-378, 1989.

GAHAN, C.G.M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*. Wiley Blackwell, Oxford, v.98, n.6, p.1345-1353, June. 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela. 2001. 629 p.

GETTY, K.J.K.; PHEBUS, R.K.; MARSDEN, J.L.; FUNG, D.Y.C.; KASTNER, C.L. *Escherichia coli* O157:H7 and fermented sausages: a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, USA: Wiley, v.8, p.141-170. 2000.

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*, Elsevier, v.10, p.139-157. 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, Lisboa: Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, n. 64, p.12-22. 2000.

GUERRA, M.M; BERNARDO, F.M.A. Influência da microflora de cura na ocorrência de *Listeria* spp. em queijos tradicionais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.100, n.555-556, p.185-188. 2005.

HAJDENWURCEL, J.R. *Atlas de Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2004, v.1. 66p.

HAMES, J; VOGEL, M. The genus *Lactobacillus* In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W. H. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. USA: Chapman & Hall, 1995, v. 2. 397 p.

HARDIE, J.M. Genus *Streptococcus*. In: SNEATH, P.H.A, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins. USA. v. 2, p. 1043-1070. 1986.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification an overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. n.83, p.1-11. 1997.

Disponível em:

<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/tefb/enterococcus/5enterococcus.pdf>

Acesso em: maio 2009.

HASLER C. M. Functional Foods for Health Program. Department of Food Science and Human Nutrition University of Illinois. *Food Technology*. Chicago, v. 52, n.2, p.57-62, 1998.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; FERREIRA, S.H.P. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista de Nutrição. Brazilian Journal of Nutrition*. Campinas, v.18, n.5, p.613-622, set/oct. 2005.

HOFFMANN, F.L.; PAGNOCCA, F.C.; FAZIO, M.L.S.; VINTURIM, T.M. Estudo Higiênico-Sanitário de Diferentes Tipos de Iogurte. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*. Curitiba, v.15, n.2, p. 187-196, jul./dez.1997.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, Canadian Institute of Food Science and Technology: Elsevier, v. 35, n. 2, p.109-116. 2002.

JACK, R.W; TAGG, J.R; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Review*. American Society by microbiology, v. 59, p. 171-200, 1995.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; NETO, C.B.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L.. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápias do Nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.43, n.9, set.. 2008.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KANDLER, OTTO; WEISS, NORBERT. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A. et al. Regular, Nonsporing Gram Positive Rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins. USA. v.2, cap. 14, p. 1208-1260. 1986.

KAYSER, V.L. *Atividade Antimicrobiana de Bactérias Lácticas Isoladas de Embutidos Curados Frente à S. aureus, L. monocytogenes e Salmonella spp.* Frederico Westphalen, 2007, 37f. Monografia (Conclusão de Curso Ciências Biológicas) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Frederico Westphalen. Jul 2007.

KEMPKA, A.P; KRUGER, R.L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHER, H.; CANSIAN, R., OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.0, p. 170-177, dez. 2008.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review*. USA: Wiley, v. 12, p. 39-85, set. 1993.

KLOOS, W.E.; SCHILEIFER, K.H. Differentiation and characteristics of the species of the genus *Staphylococcus*. In: SNEATH, P.H.A. et al. Gram Positive Cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins. USA. v.2, cap. 12, p. 1013-1021. 1986.

KOLTER, R.; MORENO, F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Review Microbiology*. USA, v. 46, p. 141-163. 1992.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v.44, n.3, jul/set. 2008.

LACERDA, T.M.; KOBAYASI, M.S.; ALCARDE, V.E. Preparação de bebidas lácteas empregando fermentação contínua e descontínua, utilizando como substrato diferentes concentrações de soro e queijo e otimização dos dados de fermentação. In: *15º Congresso de Pesquisa. 5º amostra Acadêmica UNIMEP*. Piracicaba, 22-25 de outubro de 2007.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, v.15, n.2, p.67-78, feb. 2004.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, v. 57, n.6, p. 1683-1688, jun. 1991.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology Methods*. Elsevier, v. 13, n.2, p. 145-150, jun. 1991.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. *FEMS Microbiology*. Elsevier, v.87, n.1-2, p.149- 164, set.1990.

LIMA, R.M.T.L.; FERRAZ, L.P.S.; LIMA, R.C.T.; ARAÚJO, G.T.; PAIVA, J.E.; SHINOHARAE, N.K.S.; LOPES, E.J.T. Análise Microbiológica e Físico Química de Bebidas Lácteas Comercializadas no Recife - PE. In: *VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*. Pernambuco: UFRPE, 19-23 out. 2009.

Disponível em: http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/lista_area_14.htm

LODDI, M.M. Probióticos e Prebióticos na nutrição de aves. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. n. 23, p.51-56. 2001.

LOGUÉRCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan/fev. 2001.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. Elsevier, v. 11, n.1-2, p. 1-17, jan. 2002.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. Elsevier, v.14, n.1, p. 47-53, jan. 2004.

MACHADO, D.F.; FERREIRA, C.L.F.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, T.T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MADSEN, K. L. The use of probiotics in a gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*. Canadá: Kingston, v.15, n. 12, p. 817-822. 2001.

MARTINEZ, B.E.G.; TREVIÑO, M.G.; SALAS, Z.S. Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, v.4, n.2, abr/jun. 2003.

Disponível : <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
Acesso em: dez 2005.

MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados à vácuo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, n.2, mai/ago. 2003.

MARTINS, F.O.; et al. Elaboração de Bebida Láctea Probiótica Utilizando Leite Acidófilo. In: *Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios*, Revista do Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora, 2003, jul/ago, v.58, n.333, p. 122-125.

MATSUMOTO, S.; HARA, T; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*. The Journal of Translational Immunology, v. 140, n. 3, p. 417– 426, jun. 2005.

MCLAUCHILIN, J.; MITCELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v. 92, n. 1, p. 15-33, abr. 2004.

MELLO, N.R.; SOARES, N.F.F.S.; ANDRADE, N.J.; LIMA, D.V.; PIRES, A.C.S. Avaliação da Eficiência de Filme Antimicrobiano Incorporado com Nisina sobre o Crescimento de *Staphylococcus* spp. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Araraquara, v.17, n.1, p.91-95, jan./mar. 2006.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different foods products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. Elsevier, v. 21, n. 2, p. 213-216, abr. 2004.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 4ed. Washington: APHA. cap.35, p.331-341. 2001.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*. Elsevier, v.56, n.2-3, p.181-188, fev. 2003.

MIYOSHI, A; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R.C.; PONTES, D.; CHATEL, J.M.; SERROR, P.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, M.N.; AZEVEDO, M.S.P. Uso Biotecnológico de Bactérias Lácticas para Probióticos, como a Produção de Proteínas Heterólogas e como Vetores de DNA. In: *25º Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Microbiologia in Foco. Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia, ano2, n.9, jul/ago/set. 2009.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. v.19, n.1, jan./apr. 1999.

MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE B.; MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*. v.111, p. 181-187. 1993.

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D.P.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos gram-positivos. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v. 11, n. 4, p. 322-328, out./dez. 2008.

NEVES, L.S. *Fermentado Probiótico de Suco de Maçã*. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005. 94p.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas

em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, p.172-176, dec. 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. São Paulo, v. 38, n. 1, jan./mar., p.1-21, 2002.

ORDOÑEZ, J.A. *Alimentos de Origem Animal. Tecnologia de Alimentos*. Trad Fátima Murad. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, v.2, p.67-83. 2005. 279 p.

PEREIRA, V.G.; GOMÉZ, R.J.H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de Bactérias Lácticas em Iogurte Adicionado de Biomassa da Microalga *Spirulina platensis* Durante o Armazenamento Refrigerado. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Araraquara, v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 2007.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. J. Inhibiting Factors Produced by Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins and Other Antibacterial Substances. *Le Lait. Dairy Science and Technology*. França: EDP Sciences, v.72, n.2, p.113-142. 1992.

PIARD, J.C.; HAUTEFORT, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, S.D.; FONS, M.; GRUSS, A. Cell wall anchoring of the Streptococcus pyogenes M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology, v.179, n.9, p.3068-3072. 1997.

PINTO, M. S., et al. Estudo da Viabilidade de *Lactobacilli* em Leites Fermentados no Mercado Brasileiro. In: *Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios*, Revista do Instituto Cândido Tostes, Juíz de Fora, 2003, jul/ago, v.58, n.333, p. 198-201.

POPPI, L.B.; MANCILHA, I.M.; FERREIRA, A.J.P.; LEAL, D.D.M. Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes in vitro*. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas: ITAL, v.11, n.2, p.113-119, abr/jun, 2008.

PORTUGUAL, J. A. B.; CASTRO, M.C.D.; SILVA, P.H.F. *O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais*. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, p.183-203. 2001. 204 p.

PRADO, F.C. *Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Bebida Probiótica à Base de Água de Coco*. Curitiba, 2007, 165 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar, análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. Dossiê As Empresas e as Ciências Sociais na Crise da Modernidade. *Revista de Sociologia e Política*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, v.16, n.31, nov. 2008.

REDONDO, M.C. *Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416*. Araraquara, 2008, 71 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Araraquara, 2008.

REIS, A.R.N.; GOULART, P.F.P.G; SILVEIRA, I.A. Elaboração de Bebida Simbiótica e Avaliação de sua Qualidade Sensorial e Microbiológica. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.21, n.151, p. 31-36, maio. 2007.

ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y. Microbiology of Fermented Milks. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products*. 2 ed. London and New York: Elsevier Applied Science, v.2, p. 291-343. 1990. 409p.

RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos – Food Science and Technology*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia, v.21, n.3, p. 304-309, set-dez. 2001.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L.F.T.; TOLEDO, R.S. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. In: FERREIRA, C. L. F. *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.181-202.

RUIZ, F.O.; GERBALDO, G.; ASURMENDI, P.; PASCUAL, L.M.; GIORDANO, W.; BARBERIS, I. Antimicrobial Activity, Inhibition of Urogenital Pathogens and Synergistic Interactions Between Lactobacillus Strains. *Current Microbiology*. Springer link, v.59, n.5, p.497-501. 2009.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. Elsevier, v. 84, n. 3, p. 197-215, dez. 2000.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. Elsevier, v. 8, n.5/6, p. 341-347, mai/jun. 1998.

SANTO, M.L.P.E. *Efeito da Bacteriocinogenicidade do Lactobacillus sakei 2a na Qualidade Microbiológica da Sardinha Verdadeira (Sardinella brasiliensis) Fermentada*. Florianópolis, 2003, 200 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

SANTOS, J.M.; SÁ, L.C. Probióticos: iogurte e leite fermentado no controle da enterocolite associada à antibióticos. *Revista Científica do Centro Universitário de Barra Mansa*. Barra Mansa: UBM, v.9, n.17, p.28, jul. 2007.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alimentos e*

Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition. Araraquara, v.14, n.2, p. 229-235. 2003.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHAPE, M.E. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, p.1235-1245. 1986.

SHORTT, C. The Probiotic Century: Historical and Currente Prespectives. *Trends Food Sciences Technology*. Oxford. v.10.1999.

SILVA, S.V. *Desenvolvimento de logurte Probiótico com Prebiótico*. Santa Maria, 2007, 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2007.

SOAVE, P.B.; LACERDA, THM. Acompanhamento da Vida Útil de Bebidas Lácteas: Influência do Soro do Queijo e Culturas Contendo Organismos Probióticos. In: 15º *Congresso de Iniciação Científica*. V Amostra Acadêmica UNIMEP. Piracicaba, out, 2007, p.1-9.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA, N. M. A.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia em Alimentos*. Campinas, v. 2, n. 37, p. 127-135, 2003.

TAGG, J.R; DAJANI, A.S; WANNAMAKER, L.M. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Review*. American Society Microbiology, v.40, n.3, p. 722-756, set. 1976.

TAMINE, A.Y. Microbiology of “Starter Cultures”. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products*. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, v.2, p.131-201, 1990. 409p.

TAMINE, A.Y.; DEETH, H.C. Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*. USA: International Association for food Protection, v.43, n.12, p.939-977. 1980.

TANTILLO, M.G.; DI PINTO, A.; NOVELLO, L. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. *Microbiologica. New Microbiology*. v.25, n.1, p.45 – 49, jan. 2002.

TORO, C.R. *Uso de Bactérias Lácticas Probióticas na Alimentação de Camarões *Litopenaeus annamei* como Inibidoras de Microrganismos Patogênicos e Estimulantes do Sistema Imune*. Curitiba, 2005, 153 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press. p.113-144. 2003.

VARAVALLO, M.A.; THOMÉ, J.N., TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun. 2008.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUESBERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. Washington: American Society for Microbiology, v. 14, n. 3, p. 584-640, jul. 2001.

VEISSEYRE, R. *Lactologia Técnica – Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. España: Acribia, Zaragoza. p.288-291, 1988.

VICTAL, C.L.; KNIGHT, I.C.S. *Avaliação da Vida Útil de Bebidas Lácteas Fermentadas Obtidas por Fermentação Contínua e Descontínua*.

Disponível em:

<http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/4mostra/pdfs/108.pdf>

Acesso em: maio 2009.

VIEGAS, R.P. *Leites Fermentados Probióticos Produzidos a Partir de Bactérias Ácido Lácticas e Adicionados de Concentrado Protéico de Soro Lácteo: Características Físico-Químicas, Microbiológicas e Sensoriais*. Belo Horizonte, 2008, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, 2008.

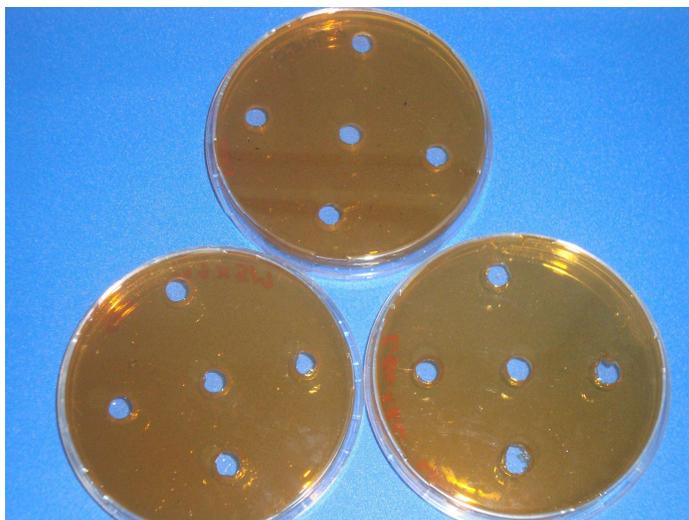
VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. Elsevier, v.36, n.9, p.895-904. 2003.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v.24, n.4, oct/dec. 2004.

WALLS, I.; BUCHANAN, R. L. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food Control*. Elsevier, v. 16, n. 9, p. 795-799, 2005.

WILLET, H. P. Metabolismo energético. In: Joklik, W. K.; Willet, H. P.; Amos, D. B. *Microbiología*. 18 ed. Buenos Aires: Zinsser, 1989. 558p.

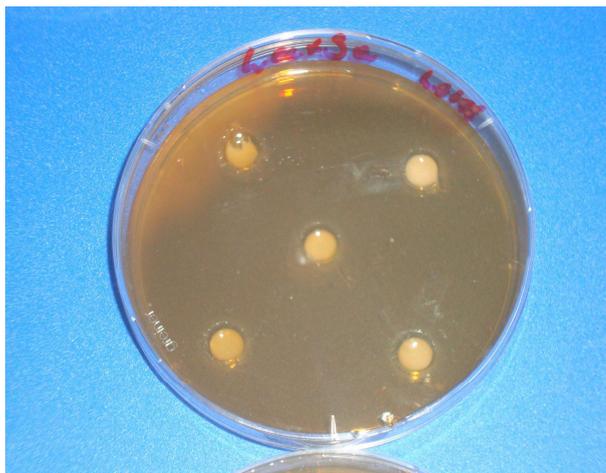
6 APÊNDICES



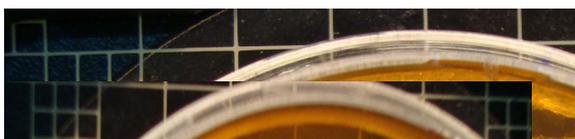
6.1 Placas de Petri com ágar MRS e poços confeccionados para realização do teste do antagonismo bacteriano.



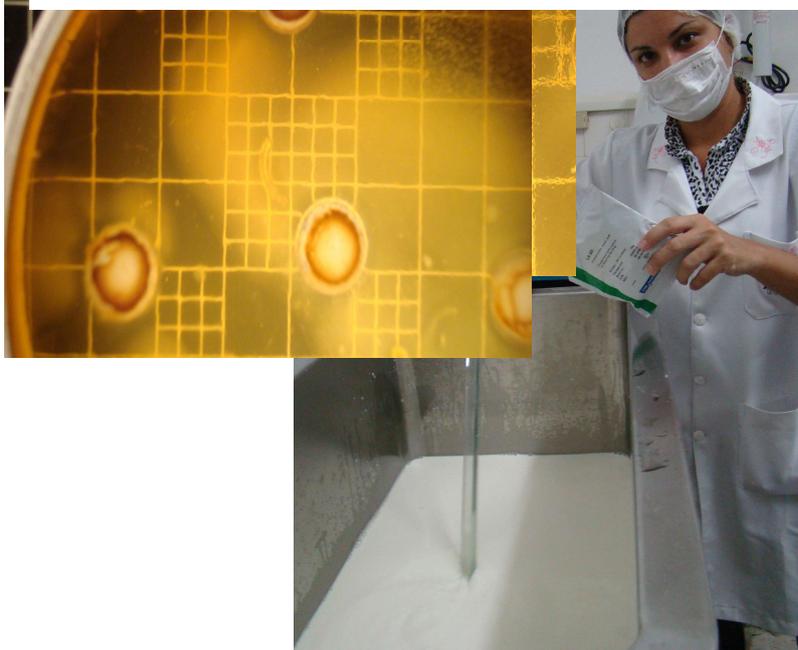
6.2 Ativação da cultura de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*; e *Lactobacillus acidophilus* em caldo MRS e leite esterilizado.



6.3 Placa de Petri com ágar MRS semeado com a cultura láctica teste (*L. acidophilus*) em poços e sobrecamada da estirpe patogênica indicadora (*S. aureus*).



6.4 Visualização dos halos de inibição formados no teste do antagonismo *in vitro*



6.5 Elaboração do leite fermentado no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados (UFF); adição da cultura láctica probiótica (2009).



6.6 Incubação dos leites fermentados após o envase em estufa a 45°C para favorecer o processo de fermentação.



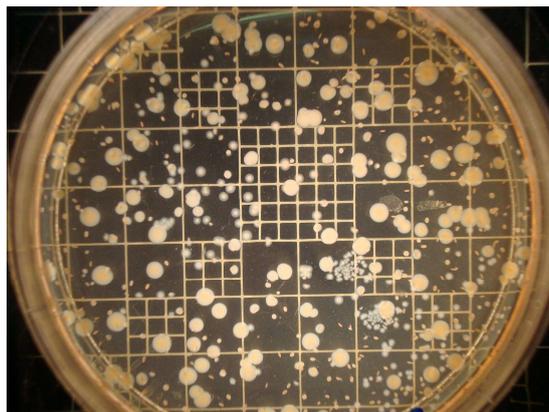
6.7 Avaliação do pH do leite fermentado durante a estocagem sob refrigeração



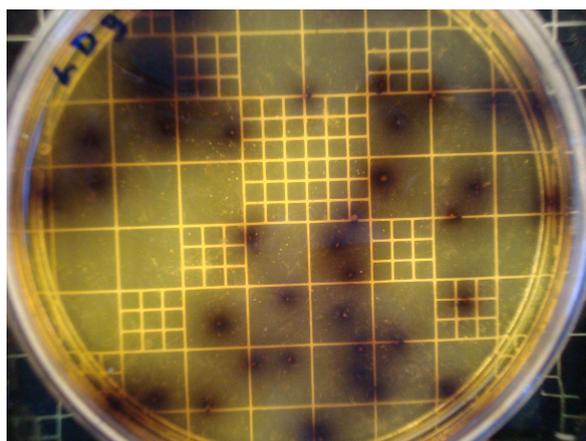
6.8 Avaliação da acidez do leite fermentado pelo método de Dornic durante o período de armazenamento sob refrigeração



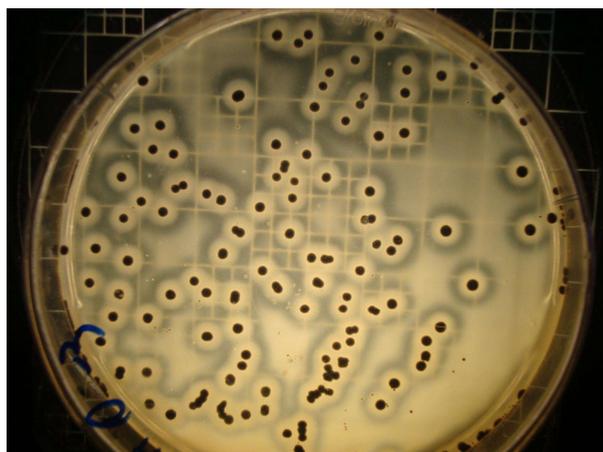
6.9 Placas com ágar MRS semeadas com culturas lácticas incubadas em jarras de anaerobiose



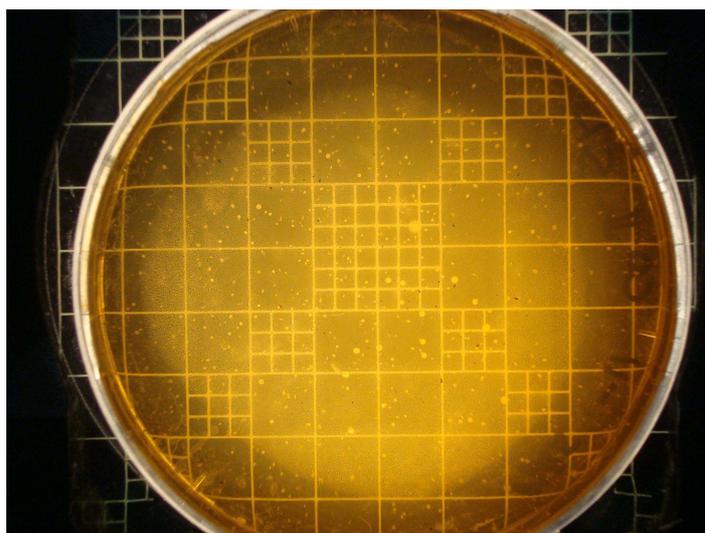
6.10 Placa de Petri com meio de cultura ágar Mac Conkey Sorbitol e UFC características de *E. coli* O157:H7



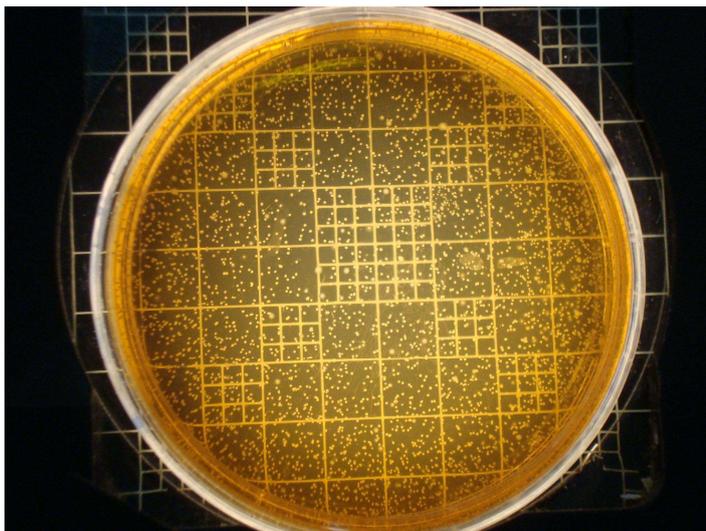
6.11 Placa de Petri com meio de cultura *Listeria* Agar Selectivo Oxford e UFC características de *Listeria monocytogenes*



6.12 Placa de Petri com meio de cultura ágar Baird Parker e UFC características de *S. aureus*



6.13 Placa de Petri com ágar MRS e UFC típicas da cultura láctica mista (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*)



6.14 Placa de Petri com ágar MRS e UFC típicas de *Lactobacillus acidophilus*