

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Mirisneide Ladislau Vieira

**Sugestão de Protocolo para Controle de qualidade
microbiológico em alimentos contendo *Lactobacillus
acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.**

Belo Horizonte

2011

Mirisneide Ladislau Vieira

Sugestão de Protocolo para Controle de qualidade microbiológico em alimentos contendo *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium bifidum*.

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de especialista.

Orientador: Álvaro Cantini

Belo Horizonte
2011

DEDICATÓRIA

A minha família pelo incansável sacrifício e dedicação, pela força e incentivo durante todo período de estudo e trabalho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por estar sempre presente em nossas vidas nos guiando nesta longa caminhada. Aos nossos familiares que nos ajudaram sem medir esforços. Aos funcionários da UFMG em especial ao pessoal da coordenação do curso, Douglas e Thiago que sempre estiveram dispostos a nos ajudar com carinho e dedicação. Ao professor Álvaro pela orientação, paciência, esforço e determinação demonstrados durante todo o período de execução deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigado por terem contribuído para concretizar mais um sucesso em minha vida!

RESUMO

Bactérias como Bifidobactéria e Lactobacilos são importantes para a saúde humana, pois quando consumidas, podem aumentar o número e a atividade dos microrganismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro. São muitas as doenças em que estas bactérias têm efeitos benéficos, facilitando a formação da chamada barreira probiótica no intestino, impedindo assim, a colonização da microbiota por bactérias patogênicas. Alguns dos mecanismos descritos para esse impedimento é a competição que ocorre no intestino favorecendo o estímulo do sistema imunológico conseqüentemente facilitando a defesa do organismo. Os alimentos que contém probióticos são chamados de Alimentos Funcionais, como por exemplo, os leites fermentados que ajudam hoje pessoas com câncer de cólon, doença de Cronh, diarréias causadas por vírus e bactérias e diarréia do viajante. Porém, para que essas mesmas bactérias sejam realmente eficazes, é necessário que sejam resistentes ao suco gástrico e à bile, para que possam chegar viáveis ao ambiente intestinal e desempenhar suas funções. Assim, este trabalho tem como objetivo sugerir um protocolo para controle microbiológico de alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

ABSTRACT

Bacteria such as Bifidobacteria and Lactobacilli are important to human health, because when consumed, can increase the number and activity of intestinal microorganisms with useful properties to the host. Many diseases that these bacteria are beneficial, helping the formation of so-called probiotic in the gut barrier, thus preventing microbial colonization by pathogenic bacteria. Some of the mechanisms described for this impediment is the competition in the intestine favors the stimulation of the immune system thereby facilitating the body's defense. Foods that contain probiotics are called functional foods, such as fermented milk that help today's people with colon cancer, Cronh disease, diarrhea caused by viruses and bacteria and traveler's diarrhea. However, for these same bacteria are truly effective, they must be resistant to gastric juice and bile, so that they reach the viable intestinal environment and perform their duties. This study aims to suggest a protocol for microbiological control of foods containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidumbacteria* sp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1.1 Desenvolvimento da microbiota intestinal.....	12
3.1.2 Diferenciação da microbiota intestinal.....	13
3.2 Classificação e tipos de probióticos.....	14
3.2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
3.2.2 Propriedades do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
3.2.3 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	18
3.2.4 Propriedades do <i>Bifidobacterium bifidum</i>	18
3.3 Mecanismos de ação dos probióticos.....	19
3.4 O que são alimentos funcionais.....	21
3.5 O que são probióticos.....	22
3.5.1 Critérios para a escolha de probióticos para a fabricação de produtos alimentícios.....	23
3.6 Controle de qualidade microbiológico.....	24
3.6.1 Contagem de bactérias lácticas.....	24
3.6.2 Preparação da amostra e diluições seriadas.....	25
3.6.2.1 Materiais e equipamentos.....	26
3.6.2.2 Procedimento detalhado.....	27
3.6.3 Contagem das colônias e Cálculo dos resultados.....	28
3.7 Pesquisa de patógenos.....	29
3.7.1 Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	29
3.7.1.1 Material.....	30
3.7.1.2 Procedimento detalhada.....	30
3.7.2 Liberação dos resultados.....	37
3.8 Determinação de <i>Salmonella</i>	37
3.8.1. Material.....	37
3.8.1.2 Procedimento.....	38

3.9 Determinação do número de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	42
3.9.1 Material.....	43
3.9.2 Procedimento.....	43
4 METODOLOGIA.....	44
5 CONCLUSÃO	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....

1 INTRODUÇÃO

Consumidores preocupados com a saúde estão cada vez mais buscando alimentos que possam controlar sua própria saúde e o bem-estar. Esta crescente busca por uma alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem colaborado para incentivar pesquisas de novos componentes naturais biologicamente ativos e tem mudado o entendimento do papel da dieta sobre a saúde (ADA, 2004; THAMER; PENNA, 2006; ARAÚJO, 2007).

O alimento é essencial à vida humana, responsável por fornecer todos os elementos necessários para o homem, não só para desenvolvimento físico, mas também todas as atividades intelectuais e sociais. Estudos mostram que a qualidade de vida está intimamente associada com o tipo de dieta diária, como também com o estilo de vida de cada indivíduo (MOURA, 2005; CRUZ *et al.*, 2007). Inúmeros fatores influenciam a qualidade da vida moderna, levando a população a conscientizar-se da importância de alimentos contendo substâncias que auxiliam a promoção da saúde, melhorando o estado nutricional. Bons hábitos alimentares podem reduzir a incidência de morte provocada por câncer, acidente vascular cerebral, aterosclerose, enfermidade hepática, dentre outros (MORAES; COLLA, 2006).

Um importante grupo de alimentos funcionais é o dos probióticos, definidos como suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos ou componentes microbianos que quando ingeridos em determinado número, apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro. Entretanto, a definição atualmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization, 2001; SANDERS, 2003). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002). O termo “funcional” implica que o alimento tem algum valor principal

identificado para o benefício da saúde, incluindo a redução do risco de doença para a pessoa que o esteja consumindo (STRINGHETA *et al.*, 2007). Os alimentos funcionais podem ser considerados como parte importante do bem-estar, no qual também se incluem uma dieta equilibrada e atividade física.

As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais comumente usadas como probióticos, mas o fermento *Saccharomyces cerevisiae* e algumas espécies de *E. coli* e *Bacillus* também são utilizadas como probióticos.

Novas técnicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sobrevivência de cepas probióticas durante o processamento e posterior ingestão. (ROSS *et al.*, 2005).

Assim, este trabalho tem como objetivo sugerir um protocolo para o controle microbiológico em alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

2 OBJETIVO GERAL

- Fazer uma revisão sobre métodos de análises microbiológicas, a fim de propor um protocolo para controle microbiológico em alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Conhecer mecanismos de ação dos probióticos;
- Mostrar através da revisão de metodologias confiáveis, os passos para análises microbiológicas, tanto para contagem total de microorganismos quanto para pesquisa de patógenos em alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento de alimentos que promovem a saúde e o bem estar é uma das prioridades de pesquisa na indústria de alimentos e vem favorecendo o consumo de alimentos enriquecidos com componentes fisiologicamente ativos tais como o probióticos e prebióticos. Neste contexto, surgem os alimentos funcionais, conhecidos também por FOSHU "*Foods for Specific Health Use*", os quais constituem hoje a prioridade de pesquisa em todo o mundo com a finalidade de elucidar as propriedades e demonstrar os efeitos benéficos destes produtos. A quantidade mínima viável para os probióticos é de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Dentre as culturas probióticas, as Bifidobacterias apresentam um grande interesse do ponto de vista industrial, em função de seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo.

3.1.1 DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL

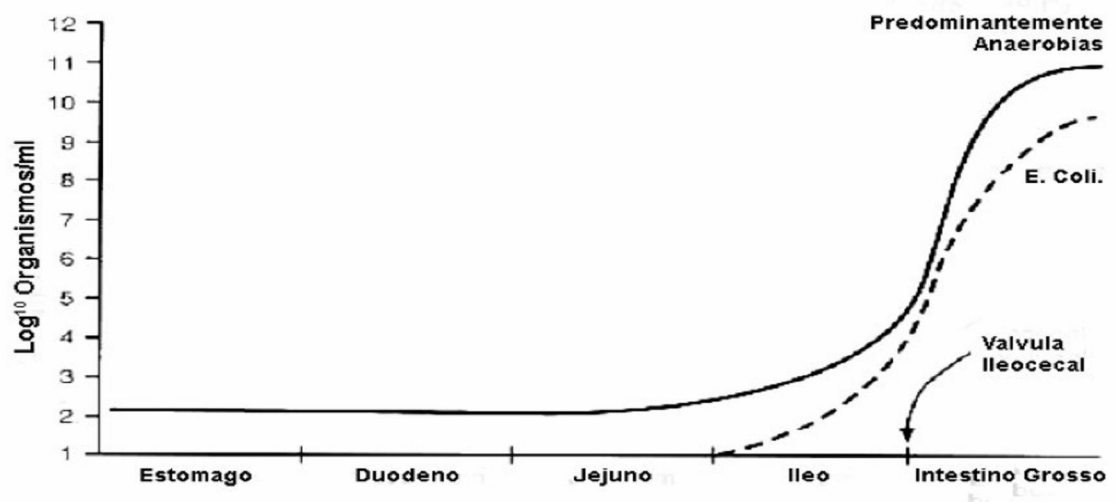
Durante o estabelecimento da microbiota intestinal, o teor elevado de oxigênio no intestino do recém-nascido favorece primeiramente o crescimento de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, como *Enterobactérias*, *Enterococos* e *Stafilococos*. Com o consumo do oxigênio por estes grupos, o ambiente torna-se altamente reduzido e, portanto, adequado ao crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, ocasionando à proliferação de Bacteróides, Bifidobactéria e Clostridium (ADLERBERTH I, 1998) A localização de predominância da flora também varia. A *Escherichia coli*, por exemplo, predomina no íleo distal e no cólon predominam a flora anaeróbia, com espécies do gênero *Bacteróides* sendo encontradas com mais freqüência (BORBA LM, 2003).

3.1.2 Diferenciação da Microbiota Intestinal, de acordo com a região do Trato Gastrointestinal

Em diferentes regiões do trato gastrointestinal estão presentes grupos específicos de microrganismos, que são capazes de produzir uma grande variedade de compostos, com variados efeitos na fisiologia. A colonização do trato gastrointestinal compreende uma população bacteriana estável. As bactérias nativas não se proliferam aleatoriamente no trato gastrointestinal, sendo que determinadas espécies são encontradas em concentrações e regiões específicas (BORBA LM, 2003). A regulação ocorre, portanto, pelo próprio meio, devido à presença dos diversos grupos que se estabelecem à medida que as condições apresentam-se favoráveis em relação às interações microbianas e substâncias inerentes ao seu metabolismo, aos fatores fisiológicos do hospedeiro, como estado clínico, idade, o trânsito, o pH intestinal, suscetibilidade a infecções, estado imunológico e nutrientes provenientes da dieta alimentar (CARVALHO, 2004; CASTILHO, 2006). A cavidade oral contém uma mistura de microrganismos, em especial bactérias anaeróbicas, encontradas na concentração de 10^6 - 10^9 UFC/ml, em especial: *Bifidobactéria*, *Propionibactéria*, *Bacterióides*, *Fusobactéria*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococci*, *Streptococci*, *Veillonella* e *Treponema*. Normalmente há pouca ação bacteriana no estômago, pois o ácido clorídrico atua como um agente germicida. As condições marcadas pela secreção diminuída de ácido clorídrico podem diminuir a resistência à ação bacteriana, ocasionalmente levando à inflamação da mucosa gástrica ou um risco maior de super crescimento no intestino delgado, que em geral é relativamente estéril (MCFARLAND, 2000). A microbiota do intestino delgado consiste em 10^3 - 10^4 UFC / ml do íleo proximal, com predominância de bactérias gram-positivas aeróbicas e 10^{11} - 10^{12} UFC/mL do íleo distal, com concentração de bactérias gram-negativas anaeróbicas. O curto espaço de trânsito através do intestino delgado não permite maior crescimento bacteriano. Segundo ainda McFarland (2000) o trato gastrointestinal humano contém aproximadamente 10^{14} bactérias, representando mais de 500 espécies diferentes. No cólon, no qual o tempo de trânsito é mais prolongado ocorre o estabelecimento de uma microbiota bastante rica. No intestino grosso como um todo há três níveis distintos que

podem ser observados, sendo uma microbiota predominante, um grupo de subdominante e um grupo residual. A microbiota dominante ($10^9 - 10^{11}$ UFC/ml de conteúdo) é constituída por bactérias anaeróbias estritas como *Bacteróides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*. Na microbiota subdominante (10^7-10^8 UFC/ml de conteúdo), predomina as bactérias anaeróbias facultativa, dentre elas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e algumas vezes *Lactobacillos*. Na microbiota residual ($< 10^7$ UFC/mL de conteúdo), há uma grande variedade de microorganismos procarióticos: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, além de eucarióticos: leveduras e protozoários (NICOLI, 2003). Na figura abaixo adaptada pela AFMCP nos mostra a distribuição bacteriana ao longo do trato gastrointestinal.

FIGURA 1 - Distribuição bacteriana ao longo do trato gastrointestinal



Fonte: Adaptado de AFMCP, 2007.

3.2 CLASSIFICAÇÃO E TIPOS DE PROBIOTICOS

Os probióticos mais utilizados são estirpes de bactérias produtoras de ácido láctico como *Lactobacillus*, que são bactérias anaeróbias facultativas e Gram positivas e normalmente são predominante no intestino delgado, e *Bifidobacterium*, bactérias aeróbicas estritas ou anaeróbicas, Gram positivas e presentes no cólon. Cerca de 56 espécies do gênero *Lactobacillus* foram descritas até hoje. Essas bactérias estão distribuídas por vários nichos

ecológicos, sendo encontradas por todo o trato gastrointestinal e geniturinário, constituindo uma importante parte da microbiota de homens e animais. A sua distribuição, porém, é afetada por diversos fatores ambientais como: pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substrato específico, presença de secreções e interações bacterianas, tendo propriedades potencialmente probióticas, favorecendo beneficemente o organismo humano. Por isto, *L. acidophilus* e *L. casei* têm sido amplamente utilizados pelos laticínios para produção de leites fermentados e outros derivados lácteos. (SOZZI, 1980; PEDROSA, 1995; MUSTAPHA, 1997; GUERIN-DANANET, 1998; GOMES, 1999). A viabilidade de *L. acidophilus* pode ser melhorada nos produtos pela seleção adequada de cepas resistentes a acidez estomacal e a bile, utilização de recipientes impermeáveis ao oxigênio, fermentação em duas etapas, adaptação ao estresse, incorporação de peptídeos e aminoácidos (GOMES, 1999). Entretanto, deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER, 2003).

3.2.1 *Lactobacillus acidophilus*

As cepas de *Lactobacillus acidophilus* é um dos probióticos mais utilizado. Trata-se de um tipo de bactéria saudável que normalmente habita os intestinos e a vagina, proporcionando proteção contra a entrada e proliferação de microrganismos patogênicos.

3.2.2 Propriedades do *Lactobacillus acidophilus*

Presente na parede do intestino delgado, na parede da vagina, no cérvix e na uretra, o *Lactobacillus acidophilus* possui ação antimicrobiana comprovada contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *C. albicans*, *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Klebsiella*. Isto é conseguido através de uma variedade de mecanismos. Por exemplo, a quebra dos alimentos pelo *L. acidophilus* leva a produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio, e outros subprodutos que

tornam o ambiente hostil para microorganismos indesejáveis. O *L.acidophilus* produz a enzima lactase em grande quantidade. Essa enzima fraciona as moléculas do açúcar presente no leite (lactose) em açúcares mais simples que podem ser facilmente digeridos. As pessoas com intolerância à lactose não produzem essa enzima, e podem se beneficiar do uso de suplementos de *L. acidophilus* e outras bactérias benéficas são resistentes aos ácidos e à bÍlis. São, portanto, capazes de sobreviver ao trânsito através do trato gastrintestinal após serem ingeridos. Estudos com humanos e com animais mostraram os benefícios diretos do consumo regular de *L.acidophilus* e outras bactérias benéficas sobre a função do sistema imune. No geral as bactérias probióticos tendem a resultar em capacidade aprimorada do sistema imune em reconhecer e destruir organismos invasores. Os estudos sugerem também que as bactérias lácticas (entre elas *L.acidophilus*) podem estimular a imunidade não específica. Diversos componentes chave do sistema imune, incluindo macrófagos, imunoglobulinas e citosinas, são alterados pela ingestão regular de lactobacilos probióticos. Sabe-se que as contagens de células sangüíneas brancas aumentam em número e atividade após 1 a 2 semanas de consumo dos mesmos .É importante ressaltar que a resistência a infecções virais e bacterianas é melhorada de forma significativa com o consumo regular de lactobacilos probióticos .Em geral, pode-se considerar efeito probiótico a utilização de um bilhão de unidades formadoras de colônias (UFC), variando a dose conforme o tipo de bactéria, a qualidade da preparação e o objetivo (JELEN; LUTZ, 1998).

Os principais probióticos utilizados comercialmente estão representados na tabela 1:

TABELA 1 - Produtos probióticos comercializados

Tipo de Alimento	Tipos de bactérias			Quantidade de Viável	Posologia
Life Flora	L.acidophilus; L.paracasei e subsp.paracasei	B.lactis; B.langum	S.termophilus	5 bilhões	Ad.1 cáps.3xdia por 4 dias,depois passar para 1cáps ao dia
Mulfidophil s	L.acidophilus, L.bulgaricus	B.bifidum		5 bilhões	
Vital Imune	L.rhamnosus;Lcasei; L.acidophilus.	B.lagum		3 bilhões	Ad.1ª2 cáps por dia
Vital Plex	L.acidophilus.; L.rhamnosus;	B.bifidum ; B.lactis		2,5 bilhões	Ad.1cáps.ao dia
Lactofos	L.rhamnosus; L.acidophilus.; Lcasei	B.bifidum	FOS 6g	4 bilhões	Ad./Crianças + de 2ª:1 a 2 saches/dia; Crianças< 2 anos ½ sache 1xdia
Symbiofort	Lcasei L.acidophilus.; L.lactis	B.bifidum		4 bilhões	Ad.1ª2 saches/dia
Lactivos	L.acidophilus.;		Vit.B1(0,9mg) Vit.B2(1,1mg) Vit.B6(1,1mg) Vit.C(45mg) Cálcio quelado(200mg); Manésio quelado (120mg);Fibra(6,89g)	1 bilhão	1 a 3 saches (7,5g)dia por 10 dias. Descanso por 20 dias(no caso de uso preventivo)
Lacto b	L.paracasei	B.lactis	Fibra 0,9g	2 bilhões	Adultos/criança s+de 2ª 1 a 2 sach/dia.Crianç a<2 anos:1/2 a 1 sache/dia.
Lactopro	L.paracasei; L.rhamnosus; L.acidophilus	B.lactis	Fibra 0,9g	3 bilhões	Adultos/criança s+de 2ª 1 a 2 sach/dia.Crianç a<2 anos:1/2 a 1 sache/dia

Fonte: Adaptado segundo dados da pesquisa.

3.2.3 *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum é uma bactéria probiótica que foi originalmente isolada no trato intestinal de seres humanos. É um habitante específico do intestino grosso (especialmente no cólon), onde pode ser encontrado em altas concentrações. O *Bifidobacterium Bifidum* é um dos probióticos presentes na flora intestinal de crianças, ao lado de outras bifidobactérias como *B.longum* e *B.pseudocatenulatum*.

3.2.4 Propriedades do *Bifidobacterium Bifidum*

Estima-se que cerca de 400 espécies de bactérias, separadas em duas categorias, habitem o trato gastrointestinal humano: aquelas consideradas benéficas, probióticas, como, por exemplo, as Bifidobactérias e Lactobacilos e aquelas consideradas prejudiciais, nocivas, como, por exemplo, as *Enterobacteriaceae* e *Clostridium ssp* (Friedman, 2005). O isolamento das bactérias bífidas de lactentes tem importância e utilização na produção de produtos simbióticos (contém microrganismos probióticos e substâncias prebióticas) e que poderão ser empregados como adjunto dietético primeiramente em instituições hospitalares, para compor a dieta de convalescentes, com a finalidade de recompor sua microbiota intestinal e de protegê-la do efeito deletério inevitável do consumo de antibióticos, prevenindo o estabelecimento de diarréias e atenuando inflamações intestinais (FRIEDMAN, 2005; FALONY et al., 2006; OSMAN et al., 2006). As bactérias bífidas diferem de acordo com a espécie, em suas características de crescimento e resposta ao frutooligossacarídeo (MEULEN et al., 2006; AMARETTI et al., 2007). A população dominante compreende as bactérias estritamente anaeróbias: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*. Essas quatro espécies são encontradas em concentrações entre 10^8 e 10^{11} UFC/g de conteúdo intestinal em todos os seres humanos. Dentre as diferentes espécies de bactérias, as que produzem ácido láctico são sempre pesquisadas em razão dos efeitos fisiológicos que exercem

na saúde dos seres humanos e animais, cada uma apresentando uma variedade de benefícios (BOURLIOUX ET AL., 2003).

3.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

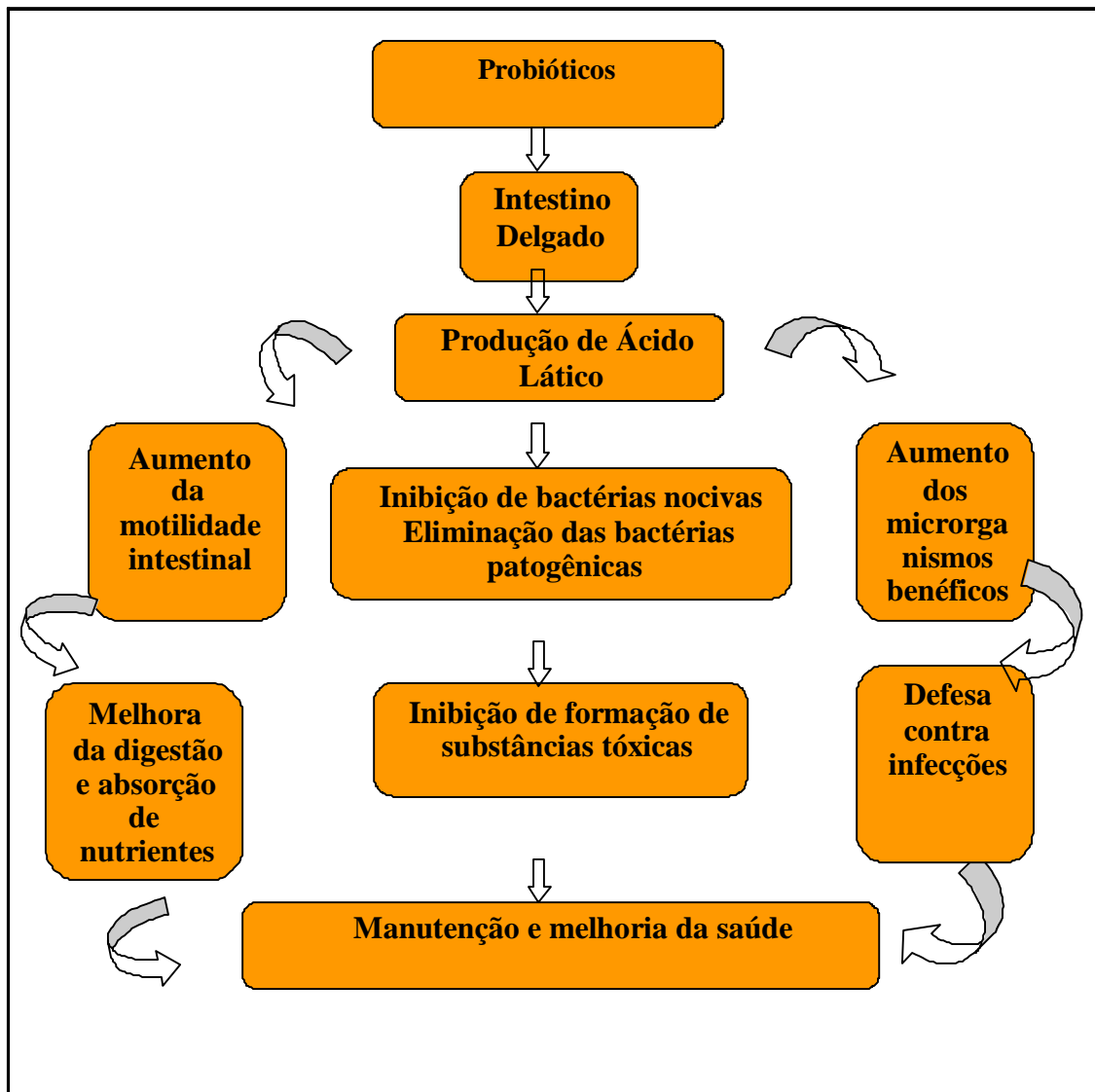
Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos incluem a síntese de substâncias microbianas contra as bactérias patogênicas, a competição por nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos patogênicos, a inibição da sua adesividade à mucosa intestinal, a modificação do pH do meio intestinal, o aumento da secreção da mucosa, a inativação das toxinas e seus receptores e a estimulação da fagocitose e das respostas imunológicas específicas ou inespecíficas contra os agentes patogênicos (FOX, 1988; MADSEN, 2001; MANNING; GIBSON, 2004; MATSUMOTO et al., 2005; PANT et al., 2007). Os probióticos normalmente têm pouco tempo de vida e ação e, por isso mesmo, devem ser mantidos bem refrigerados. Ao serem ingeridos através dos alimentos, vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, sem se fixarem, equilibrando-a e, com isso, auxiliam o trabalho de absorção dos nutrientes.

Segundo Paschoal, et al(2010) suas principais funções são:

- Nutricional: Síntese de vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B5, B6, ácido fólico, B12) e vitamina K participando de forma importante para o pool desta vitamina no organismo;
- Digestória: Síntese de enzimas digestivas, sobretudo da enzima lactase, mas também de proteases e peptidases. Regula o trânsito intestinal e a absorção dos nutrientes;
- Cardiovascular: Tem um papel na normalização do colesterol e triglicerídeos plasmáticos;
- Metabólica: As bactérias probióticas produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs, como o butirato), que são substrato metabólico para os colonócitos, promovendo, em condições ideais, 40-50% da energia requerida. Além disso, produzem enzimas citocromo P450-like, que estimulam a expressão gênica do citocromo no fígado favorecendo a desintoxicação;

- Hepática; evitam a ressíntese de hormônios já degradados e convertem muitos flavonóides às suas formas ativas;
- Efeito inibitório sobre a HMG-CoA redutase, provocando a redução da produção do colesterol;
- Auxiliam, ainda, na metabolização de medicamentos, hormônios, carcinógenos, metais tóxicos e outros xenobióticos;
- Imunomoduladora: Essas bactérias são essenciais para o desenvolvimento e a maturação do sistema imune entérico e sistêmico (GALT e MALT), visto que estimulam a expansão clonal de linfócitos e previnem sua apoptose;
- Produzem substâncias antimicrobianas que agem sobre uma vasta gama de microorganismos patogênicos, por tornarem o ambiente desfavorável ao seu crescimento e desenvolvimento;
- Previnem a adesão de patógenos através da competição por sítios receptores;
- Contribuem para a promoção da tolerância oral, mecanismo pelo qual nosso organismo passa a não reagir a determinados antígenos.
- Atuam na manutenção da barreira mucosa intestinal, assim como na produção de anticorpos (IgA intestinal e sérica), na atividade de fagócitos e na dos linfócitos matadores naturais (NK).
- Reduzem a produção intestinal de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , Interferon- γ , IL-8) e aumentam a produção intestinal de citocinas antiinflamatórias (IL-10 e TGF- β).

FIGURA 2 – Mecanismo de ação dos probióticos



Fonte: Fonte: Dados da pesquisa

3.4 O QUE SÃO ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos funcionais são definidos como um alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, onde ao ser consumido como parte da dieta usual, é capaz de produzir comprovados efeitos metabólicos e fisiológicos úteis à manutenção de uma boa saúde física e mental, além das suas funções nutricionais básicas (LAJOLA,2001). Segundo o “Institute of Medicine of the U.S National Academy of Sciences”, qualquer alimento ou ingrediente alimentar que

possa exercer efeito benéfico no organismo pode ser considerado alimento funcional (SIMHON et al, 1982). No Brasil a legislação estabelece critérios específicos para que um alimento possa ser considerado como funcional. A portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil fornece a definição legal de alimento funcional.

A ANVISA publicou duas resoluções relacionadas aos alimentos funcionais (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b):

a) aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (Resolução ANVISA/MS nº 18, de 30/04/1999).

b) aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em sua rotulagem (Resolução ANVISA/MS nº 19, de 30/04/1999).

O desenvolvimento de alimentos funcionais constitui uma real oportunidade de contribuição para a melhora da qualidade da dieta e seleção de alimentos que podem afetar positivamente a saúde e bem estar dos indivíduos. É importante destacar que um alimento pode ser funcional para a população em geral, ou para grupos particulares, definidos por suas características genéticas, sexo, idade ou outros fatores (PALOU; SERRA, 2000).

3.5 O QUE SÃO PROBIÓTICOS

Os probióticos são alimentos suplementados com microrganismos vivos e que quando consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde, além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; GIBSON; ROBERFROID, 1995; HENKER et al., 2007). Os probióticos fazem parte dos chamados Alimentos Funcionais, cujo principal alvo é a mucosa intestinal e a sua microbiota, estando inclusos neste grupo o iogurte, leites fermentados e alguns biscoitos (FULLER, 1989; BOOBIER; BAKER; DAVIES, 2006). Os probióticos mais utilizados são estirpes de bactérias produtoras de ácido láctico como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*,

que preenchem as condições para um bom probiótico (PANT et al., 2007). Esses autores restringiram o uso desse termo a produtos que contenham microorganismos viáveis que promovem a saúde de humanos ou animais, e que exercem seus efeitos no aparelho digestivo, no trato respiratório superior ou no trato urogenital (HAVENAAR et al., 1992).

3.5.1 Critérios para a escolha de probióticos para a fabricação de um produto alimentício

Cepas de uma mesma espécie são incomparáveis e podem possuir áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e seus mecanismos de ação sobre a mucosa saudável e a inflamada podem ser distintos (ISOLAURI, SALMINEN, OUWEHAND, 2004). Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso em humanos, através dos critérios mencionados anteriormente, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Além disso, com relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo a condições de processamento como a liofilização ou secagem por “spray drying” (STANTON et al., 2003). A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^6 UFC/mL ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN, LUTZ, 1998). O consumo de quantidades adequadas dos microorganismos probióticos desejados nos bioprodutos (10^9 a 10^{10} UFC /100 g de produto) são suficientes para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo* (CHARTERIS et al., 1998). Esses alimentos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do microrganismo para serem considerados probióticos como, por exemplo, conter pelo menos 10^7 UFC/g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto. Esta é uma concentração recomendada por alguns autores (RYBKA, FLEET, 1997; VINDEROLA, REINHEIMER, 2000). Entretanto, vários autores propõem que a

dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE, SALMINEN, 1995; BLANCHETTE et al., 1996; HOIER et al., 1999).

3.6 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

A contaminação bacteriológica é causada pelas bactérias propriamente ditas e/ou subprodutos das bactérias chamados de endotoxinas ou pirogênios, que podem causar sérios problemas em determinadas aplicações. Segundo Gonçalves (2007), as falhas nos procedimentos de limpeza permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies se transformem em potencial fonte de contaminação. Em determinadas situações os microorganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular.

3.6.1 Contagem de bactérias lácticas

A contagem de bactérias lácticas em alimentos é baseada principalmente na seleção de condições ótimas para o seu crescimento (condições microaerófilas e meios enriquecidos, para atender às altas exigências nutricionais), havendo pouca ênfase na criação de condições seletivas, uma vez que, nos alimentos onde sua enumeração é relevante, a microbiota competidora restringe-se quase que exclusivamente aos bolores e leveduras. Há vários meios disponíveis para a sua enumeração, sendo a escolha baseada principalmente na finalidade da análise (enumeração de fermento ou enumeração de microbiota deteriorante). Para a enumeração das cepas potencialmente deteriorantes, os meios, mais recomendados são (SILVA et al., 2007):

□ **Agar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS)**

Este meio foi desenvolvido para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* do leite. Suplementado com 0,5% de frutose, pode ser utilizados para a

enumeração de lactobacilos deteriorantes de maionese e outras coberturas ácidas para saladas (incubação a 20-28°C/5-14 dias). Para a enumeração de bactérias lácticas em vegetais fermentados ou acidificados, recomenda-se a suplementação com 0,02% de azida de sódio e incubação a 30°C por 24-96h.

□ **Rogosa SL Ágar.**

Meio com características seletivas (pH 5,4 e alta concentração de acetato), desenvolvido para o cultivo de *Lactobacillus* de origem oral e fecal. Também permite o crescimento de *Pediococcus*.

□ **Orange Serum Agar (OSA).**

Meio de enriquecimento desenvolvido especificamente para o cultivo e enumeração de microorganismos associados com a deterioração de produtos derivados de frutas cítricas, permite ótimo crescimento de *Lactobacillus* e outros microorganismos acidúricos. É particularmente indicado para a contagem total de microorganismos aeróbios em suco de laranja concentrado congelado e outros produtos derivados de laranja (incubação a 30°C/48h).

□ **APT Ágar.**

Meio de enriquecimento desenvolvido para o cultivo e enumeração de *Pediococcus* e bactérias lácticas heterofermentativas associadas à deterioração de produtos cárneos curados.

3.6.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E DILUIÇÕES SERIADAS

a)Abertura das embalagens

Antes de abrir as embalagens, deve-se desinfetar a área externa com etanol 70%, para remover os contaminantes presentes.

b)Retirada da unidade analítica

Segundo Silva(2007) a unidade analítica utilizada para a maioria dos alimentos é de 25 g, retirada assepticamente da amostra e transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado e tarado, onde será posteriormente

homogeneizada e diluída. Há casos especiais em que a unidade analítica, deve-se obedecer os seguintes cuidados:

b.) Cuidados assépticos

A abertura das embalagens, a retirada e pesagem da unidade analítica devem ser feitas, preferencialmente, no interior de câmeras de fluxo laminar, para prevenir qualquer contaminação ambiente da amostra. Na indisponibilidade de uma câmera de fluxo laminar, deve-se trabalhar na região próxima à chama de um bico de Bunsen de tamanho médio, chama azulada, com as portas e janelas do laboratório fechadas, para evitar correntes de ar. Todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura das embalagens e retirados das unidades analíticas (tesoura, pinças, facas, espátulas, etc.) devem ser previamente esterilizados em autoclave ou estufa de esterilização ou mergulhadas em álcool 70% e flambada no momento do uso (SILVA et al., 2007) .

b₂) Retirada da unidade analítica de amostras de líquidos concentrados e de alimentos pastosos, moídos ou em pó.

Antes da retirada da unidade analítica, essas amostras devem ser revolvidas com uma espátula estéril, para uma completa mistura e homogeneização do conteúdo. O intervalo entre a mistura e a retirada da unidade analítica não deve exceder 15 minutos (SILVA et al., 2007) .

3.6.2.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Utilizam-se os seguintes materiais e equipamentos:

- 16 placas de petri esterilizadas;
- Pipetas de 5 e 10 mL esterilizadas ou micropipetadores de 1000 µL e ponteiros estéreis.
- Bico de Bunsen;
- Caneta e pincel;
- Tubos contendo 9 mL de solução água peptonada 0,1%(H₂O_p);
- Frasco com 225 mL de solução água peptonada 0,1%(H₂O_p);

- Tubo contendo 25 mL de água peptonada 0,1%(H₂O_p);
- Ágar de Man, Rogosa & Sharpe(MRS), Rogosa SL Ágar, Orange Serum Agar(OSA), APT Ágar; 100mL de "Plate Count Agar"- Ágar Padrão de Contagem;
- Estufa bacteriológica a 30°C;
- Sistema de geração de atmosfera microaerófila.

3.6.2.2 PROCEDIMENTO DETALHADO:

- Coleta-se a amostra assepticamente de acordo com o procedimento descrito acima;
- Sanitiza-se a bancada com algodão umedecido com álcool 70%v/v;
- Liga-se o bico de busen;
- Identifica-se 16 placas de petri estéreis com o código de análise e respectivas diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) separando duas que serão utilizadas exclusivamente para controle (placa controle);
- Transferir as 25 g da amostra pesada assepticamente para um frasco com 225 mL de água peptonada 0,1%(H₂O_p); (diluição 10^{-1});
- Agitar ou inverter o recipiente com a amostra por várias vezes;
- Pipeta-se 1 mL da amostra diluída em água peptonada 0,1%(H₂O_p) transferindo-a para uma placa de petri devidamente identificada 10^{-1} (realizar em duplicata) e 1 mL para o tubo contendo 9 ml água peptonada 0,1%(H₂O_p) que será a segunda diluição(10^{-2});
- Homogeneíza-se a amostra e pipeta-se 1 mL do mesmo para um tubo de ensaio contendo 9 mL do mesmo diluente (diluição 10^{-3}) e 1ml em cada placa identificada como 10^{-2} . Preparam-se assim as diluições sucessivas necessárias às análises a serem efetuadas, conforme demonstração abaixo:

Diluição 10^{-1} : 10 mL da amostra + 90 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-2} : 1 mL da diluição 10^{-1} + 9 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-3} : 1 mL da diluição 10^{-2} + 9 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-4} : 1 mL da diluição 10^{-3} + 9 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-5} : 1 mL da diluição 10^{-4} + 9 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-6} : 1 mL da diluição 10^{-5} + 9 ml de diluição estéril

Diluição 10^{-7} : 1 mL da diluição 10^{-6} + 9 ml de diluição estéril

- Antes da transferência de cada alíquota para suas respectivas placas identificadas, agitar o tubo repetidas vezes.
- Adiciona-se a cada placa, 15-20 mL do meio escolhido, previamente fundido e resfriado a 44-46° C.
- Adiciona-se também 15-20 mL do meio escolhido em uma placa estéril sem amostra, esta placa é chamada de controle;
- Homogeneiza-se, com movimentos suaves em forma de “8” sucessivamente por 10 vezes;
- Deixa-se solidificar a temperatura ambiente;
- Incubam-se as placas em posição invertida a 30° C por 48-72 horas em atmosfera microaerófila.

Os meios de cultura devem estar esterilizados em autoclave adequadamente e a assepsia durante o procedimento de trabalho deve ser rigorosa para evitar contaminação da amostra. Para a obtenção da atmosfera microaerófila, pode-se acondicionar as placas em jarro de anaerobiose e incubar na presença de um sistema de geração de atmosfera microaerófila, disponível comercialmente (Anaerocult C MERCK 16275; Gas generating ou injetar uma microaerófila de gases com 85% N₂, 10% de CO₂ e 5% de O₂). Na indisponibilidade de qualquer uma dessas alternativas, recomenda-se recobrir a superfície das placas com uma sobre camada do mesmo meio (SILVA et al., 2007).

3.6.3 CONTAGEM DAS COLÔNIAS E CÁLCULO DOS RESULTADOS

Segundo Silva(2007) contar todas as colônias desenvolvidas nas placas com 25 a 250 colônias e calcular o resultado multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição. Após a contagem, multiplicar a média aritmética das duas placas pelo fator da diluição correspondente, expressando o resultado em unidades formadoras de colônia por mL da amostra (UFC/mL). Em seguida o

resultado é registrado no laudo de análise microbiológica da seguinte maneira: contagem total de bactérias - UFC/mL de amostra. (ANEXO A)

3.7 PESQUISAS DE PATÓGENOS

3.7.1 PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli*.

O gênero *Escherichia* com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme. Estes gêneros apresentam em comum as características de serem bastonetes curtos, gram negativos sem esporos, anaeróbios facultativos, fermentadores da lactose com produção de gás e ácido. Apresenta temperatura ótima de crescimento a 32-37 °C, em 24 a 48 horas. O grupo dos coliformes termotolerantes possui a mesma definição dos coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gases, em 24 horas a uma temperatura de 44,5 a 45,5 °C. Na contagem de coliformes pode-se diferenciar dois grupos: o de coliformes totais e o de coliformes fecais. O índice de coliformes fecais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpezas e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem. O índice de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias, visto presumir-se que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E.coli*, que tem seu habitat exclusivo no trato gastrointestinal do homem e de outros animais. Assim, sua presença indica possibilidade de ocorrerem outros microorganismos entéricos na amostra. A definição de coliformes fecais é a mesma de coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5-45,5°C. Alguns sorotipos de *Escherichia coli* são responsáveis por gastroenterites, especialmente em crianças, pessoas idosas ou convalescentes, sendo a diarreia o principal sintoma, com tempo de incubação de 6 a 36 horas e duração de dois dias. A enumeração de coliformes pode ser efetuada em

meios de cultura líquidos (técnica do número mais provável-NPM) ou em meios sólidos. Pela técnica do numero mais provável, pode-se obter informações sobre a população presuntiva de coliformes (teste presuntivo); sobre a população real de coliformes (teste confirmativo) e sobre a população de coliformes de origem fecal (SILVA et al.,2007).

3.7.1.1 MATERIAL

Meios de cultura e reagentes: Água Peptonada 0,1%%; Caldo Lauril Sulfato triptose (Caldo LST); Caldo Verde Brilhante; Lactose Bile 2%%; Caldo *Escherichia coli* (caldo EC); Agar Nutriente; Agar Eosina Azul de Metileno (Agar BEM); Agar Citrato de Simmons; Caldo de Triptona; Caldo VN-VP; Solução de Vermelho de Metila; Solução de α -Naftol 5%%; Solução de KOH 40%%; Reativo de Kovacs; bateria de gram.

Equipamentos e utensílios: estufa bacteriológica, banho-maria; tubos de ensaio; tubos de Durhan; placas de petri; erlenmeyer; pipetas; alças de semeadura; lâminas de microscopia.

3.7.1.2 PROCEDIMENTO DETALHADO

ETAPA 1 – Preparo da amostra

Retirar e pesar assepticamente 25 g da amostra e misturar com 225 mL de água peptonada 0,1% em homogeinizador estéril. Esta solução corresponderá à diluição 10^{-1} .

ETAPA 2 – Teste Presuntivo (Técnica do número mais provável)

- Identificar 3 séries de 3 tubos com as seguintes informações: amostra,data,alíquota,repetição;

- Transferir assepticamente 3 alíquotas de 1 mL de cada diluição para cada uma das 3 séries de 3 tubos contendo caldo LST e tubos de Durham invertidos;
- Homogeneizar e incubar os tubos a 35°C/24 horas;

Os tubos de ensaio são dispostos em séries numa grade conforme o QUADRO abaixo:

QUADRO 1: Esquema de preparo da amostra pelo NMP

Séries	Tubos de ensaio
1a	3 tubos de Caldo LST com tubos Durham invertidos
2a	3 tubos de Caldo LST com tubos Durham invertidos
3a	3 tubos de Caldo LST com tubos Durham invertidos

Fonte: Dados da pesquisa

A amostra é então inoculada de acordo com o QUADRO a seguir:

QUADRO 2: Diluição das amostras:

Séries	Amostra
1 ^a	1mL da amostra da diluição 10 ⁻¹ em cada tubo
2 ^a	1mL da amostra da diluição 10 ⁻² em cada tubo
3 ^a	1mL da amostra da diluição 10 ⁻³ em cada tubo

Fonte: Dados da pesquisa

- Transcorrido esse tempo, observar se houve crescimento com produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham) ou no meio, quando o tubo é agitado suavemente;
- Anotar os tubos com produção de gás (tubos positivos);
- Verificar na tabela de NMP o número correspondente e expressar o resultado em número presuntivo de coliformes/g ou mL da amostra.

- Em caso positivo passar aos itens subseqüentes. Em caso negativo, reincubar até completar 48 horas e repetir a leitura, passando para os itens subseqüentes em caso de crescimento com produção de gás.

ETAPA 3 - Teste confirmativo para coliformes totais

- De cada tubo de caldo LST positivo, transferir uma alçada para um tubo de caldo verde brilhante, previamente identificado com o código de análise e a diluição correspondente;
- Incubar os tubos em estufa a 35°C (+ou- 2°C) por 48 horas;
- Após a incubação observar se houve crescimento com produção de gás.
- Anotar o número de tubos de Verde Brilhante com gás, confirmativos da presença de coliformes totais e determinar o número mais provável (NMP) por 100 mL de amostra na tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas. (ANEXO B)

ETAPA 4 – Teste confirmativo de coliforme termotolerantes

- De cada tubo de caldo LST positivo, transferir uma alçada para um tubo de caldo *E.coli* previamente identificado;
- Incubar em banho-maria a 44,5°C ± 1°C por 24 horas. Observar se há crescimento com produção de gás e anotar o número de tubos, confirmativo da presença de coliformes termotolerantes e determinar o NMP apropriado à diluição inoculada.
- Em seguida os resultados são registrados no laudo de análise microbiológica e estes são arquivados na garantia da qualidade.

ETAPA 5 – Teste *Escherichia coli* (método tradicional)

Todas as subculturas em caldo EC serão repicadas para o Agar Eosina Azul de Metileno (BEM), com uma alça de platina fazendo estrias (por esgotamento);

Incubar as placas a 35°C/24-48 horas;

Transcorrido este tempo, verificar o crescimento de colônias com características de *E.coli*, ou seja, 2 a 3 mm de diâmetro, com brilho metálico esverdeado,co o centro escuro ou abrangendo praticamente toda colônia;

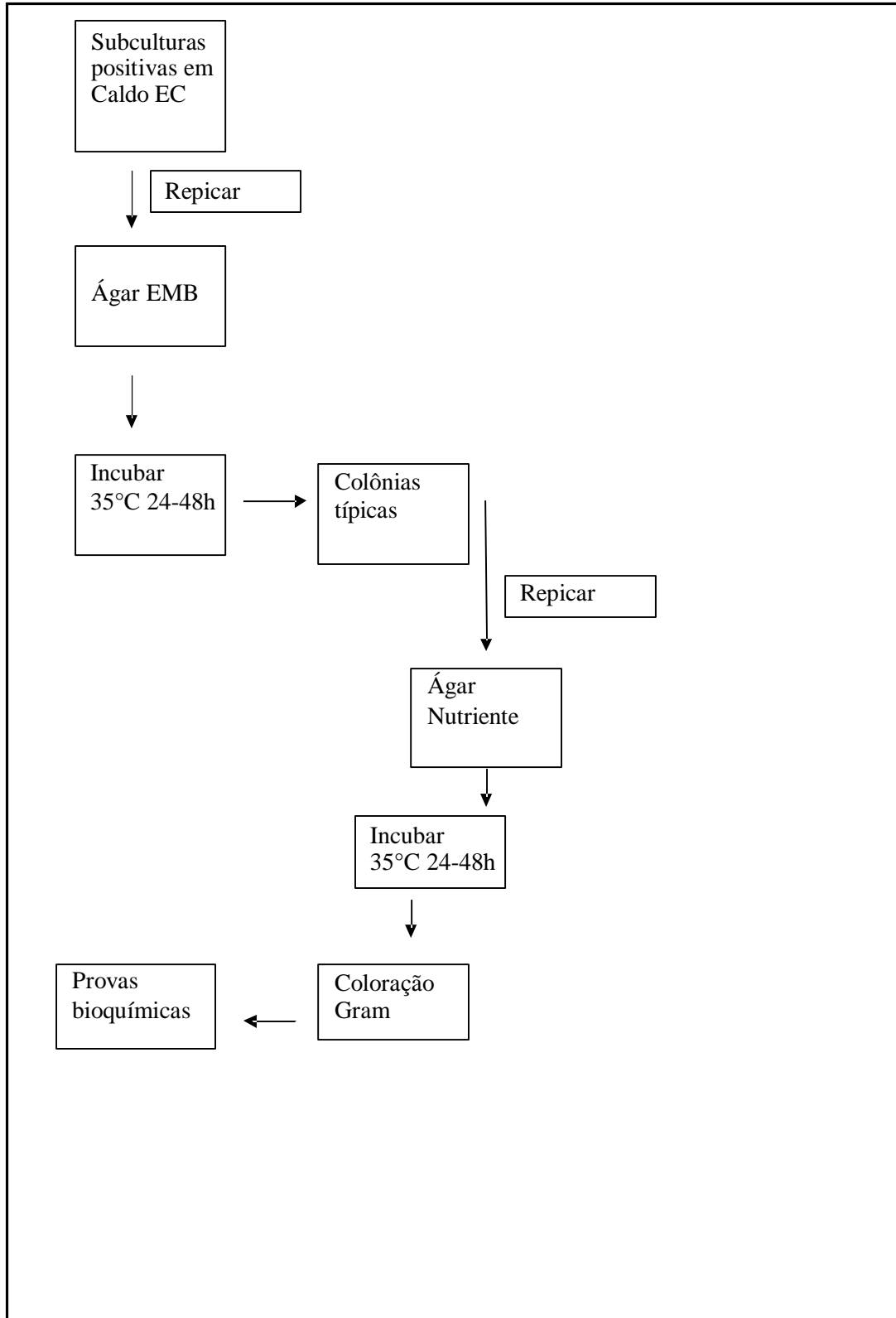
Repicar 2 a 3 colônias características para tubos com Ágar Nutriente inclinado e incubar os tubos a 35°C/24-48 horas;

A partir das culturas puras em Agar inclinado, fazer coloração de Gram e efetuar as seguintes provas bioquímicas (IMViC):

- a) Indol
- b) Vermelho de metila
- c) Voges-Proskauer
- d) Citrato de Simmons

Observação: Todos os meios podem ser inoculados a partir de uma única alçada de cultura, porém o Agar Citrato de Simmons deve ser inoculado em primeiro lugar, para evitar a introdução de compostos de carbono originários dos demais meios-testes (SILVA et al.,2007).

TABELA 2: Esquema demonstrativo para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia coli*



Fonte: Adaptado segundo dados da pesquisa.

Considerar a cultura positiva para *E.coli*, quando forem obtidos os seguintes resultados para o IMViC;

TABELA 3: Diferenciação das espécies *E. típica* e *atípica*

Indol	VM	VP	Citrato	Tipo
+	+	-	-	<i>E.coli</i> típica
-	+	-	-	<i>E.coli</i> atípica

Fonte: Adaptado segundo dados da pesquisa.

- Considerar positiva o tubo de caldo EC para *E.coli*, quando pelo menos uma cultura dele provenientes, der positivo no teste IMViC;
- Verificar na tabela de NMP o número correspondente aos tubos EC positivos para a presença de *E.coli* e expressar o resultado em NMP de *E.coli* / g ou mL.
- O teste IMViC são assim denominados os seguintes testes bioquímicos: Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer "I" Citrato, importantes para diferenciar as bactérias entéricas (intestinais) de natureza patogênica ou não, que podem estar presentes como contaminantes de alimentos.

a) Produção de Indol

Segundo Silva(2007) a ação de algumas bactérias sobre o aminoácido triptofano presente em peptonas gera um produto volátil denominado indol. A enzima responsável por essa transformação é a triptofase. A presença de indol pode ser detectada pela adição do reativo de Kovacs (3 a 4 gotas) após crescimento da cultura,resultando na formação de uma coloração vermelha na superfície do líquido (resultado positivo).A ausência da coloração vermelha indica que o triptofano não foi hidrolisado (resultado negativo).

b) Vermelho de Metila

Algumas bactérias fermentam a glicose com produção dos ácidos fórmico, acético, láctico, succínico e outros produtos. Esses ácidos promovem uma diminuição nos valores de pH do meio. Essas diferenças metabólicas podem ser evidenciadas pela adição de uma solução de vermelho de metila (indicador de pH) ao meio onde foi cultivado o microrganismo de interesse. Em meios acidificados ($\text{pH} < 4,0$), o indicador torna-se vermelho (resultado positivo), enquanto que em $\text{pH} \geq 6,0$ o indicador adquire cor amarela (resultado negativo).

c) Voges-Proskauer

Algumas bactérias fermentam a glicose com produção de ácido acético que posteriormente se transforma em produtos neutros como acetil-metil-carbinol (acetoína). A detecção de acetoína constitui a base da reação VP. Em presença de oxigênio acetil-metil-carbinol forma diacetil que ao reagir com KOH forma em complexo de cor róseo-avermelhado. Após crescimento da bactéria adiciona-se a cada tubo 0,6 mL do reagente I de Barrit (solução de α -naftol 5%) e 0,2 mL do reagente II (solução de KOH 40%) para cada mL de meio de cultura. Deixando em repouso por 15 minutos, na presença dos reagentes, a acetoína é oxidada a diacetil levando ao aparecimento de uma coloração róseo-avermelhada (resultado positivo).

d) Utilização de Citrato

A utilização do citrato com única fonte de carbono indica a presença de citrato permease, que transforma o citrato para o interior da célula. Do metabolismo do citrato é produzido piruvato e CO_2 . Este último, ao reagir com o sódio presente no meio, forma o carbonato de sódio elevando o pH. O meio Agar Citrato de Simmons (pH 7,3 verde) possui citrato de sódio como única fonte de carbono e azul de bromotimol como indicador de pH. Com o aumento do pH, o meio adquire uma cor azul (pH 7,6) indicando resultado positivo para o teste de utilização de citrato.

3.7.2 LIBERAÇÃO DOS RESULTADOS

O resultado é liberado no laudo da seguinte forma (ANEXO A):

O teste possui tempo total de 72 horas quando ocorrer crescimento nos tubos de caldo lactosado que necessite confirmação e 48 horas quando não ocorrer crescimento dos tubos de caldo lactosado.

3.8 DETERMINAÇÃO DE *SALMONELLA*

As salmonelas são bacilos gram negativo, não formadores de esporos anaeróbios facultativos, catalase-positivo, oxidase-negativa, redutores de nitratos a nitritos e geralmente, móveis com flagelos peritríquios, exceção da *S.gallinarum* e da *S.pullorum*. A maior parte destas bactérias é patogênica para o homem apesar das diferenças quanto às características e gravidade da doença que provocam. Dentre as fontes de *Salmonella* podemos destacar o intestino de animais e homem, matéria-prima animal (carnes e aves), rações animais (farinha de ossos, farinha de sangue e farinha de peixe), gema de ovos (contaminação transovariana), hortaliças plantadas em ambiente com estéreo animal ou humano. A técnica tradicional de detecção de *Salmonella* é um método cultural clássico, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis. A metodologia recomendada, embora apresente algumas variações na seleção dos meios de cultura e forma de preparação das amostras, segue basicamente 5 etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de amostra (SILVA et al., 2007).

3.8.1.1 MATERIAL

Meios de culturas e reagentes:

Caldo Lactosado ou Água Peptonada Tamponada; Caldo Rappaport (RP); Caldo Selenito Cistina; placa com Agar Hecktoen; placa de Agar Salmonella-

Shigella; placa de Agar Mac Conkey; tubo de Agar Tríplice Açúcar Ferro; tubo de Agar Lisina Ferro.

Equipamentos e utensílios:

Estufa bacteriológica; pinças, espátulas e tesouras estéreis; homogeneizadores.

3.8.1.2 PROCEDIMENTO

ETAPA 1: Processamento da amostra

Objetivo: preparar a amostra para ser analisada.

Retirar e pesar assepticamente 25 g da amostra e misturar com 225 mL de água peptonada 0,1% em homogeneizador estéril. Esta solução corresponderá à diluição 10^{-1} .

ETAPA 2: Pré-enriquecimento

Objetivo: recuperação das células injuriadas que são conseguidas incubando-se a amostra em condições não seletivas, por pelo menos 18 horas.

Realizar diluições seriadas, transferindo 1 mL da amostra contaminada para um tubo contendo 9 mL de caldo de pré-enriquecimento (Caldo Lactosado) e homogeneizar a amostra. Incubar a 35°C/18-24 horas, com a tampa ligeiramente frouxa.

ETAPA 3: Enriquecimento seletivo

Objetivo: inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*.

Agitar delicadamente o tubo com o Caldo Lactosado. Transferir 0,1 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (RP) e 1,0 mL de Caldo Tetrionato. Incubar o Caldo Rappaport Vassiliadis (RP) a 43°C e o Caldo Tetrionato a 35°C/24 horas.

ETAPA 4: Plaqueamento seletivo-diferencial

Objetivo: promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica.

Assim recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um tipo de meio de cultura seletivo. Agitar os tubos de enriquecimento seletivo. Estriar uma alçada do Caldo RP em placas de Agar Hecktoen; Agar *Salmonella* – *Shigella* e Agar Mac Conkey. Repetir o procedimento com o caldo SC. Incubar as placas a 35°C/24 horas.

ETAPA 5: Confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella*

Objetivo: verificar se as colônias típicas obtidas nas placas são realmente colônias de *Salmonella*, através de novas provas bioquímicas e sorológicas.

Verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*. Com o auxílio de uma agulha de inoculação, remover uma porção da massa de células, do centro da colônia típica e inocular em tubos inclinados de Agar Lisina Ferro (LIA) e Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). A inoculação deve ser feita por picada e estriada na rampa utilizando-se a mesma agulha para inocular ambos os tubos. Não é necessário nem recomendável flambar a agulha e retirar outra porção de colônia, entre um tubo e outro. Incubar a 35°C/24 horas.

ETAPA 6: Testes bioquímicos para confirmação definitiva

Observar se houve ocorrência de reação típica de *Salmonella*

a) Reação típica de *Salmonella* em TSI

Rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do Agar). Reação atípica em TSI, que não deve ser

descartada se as demais reações de LIA se apresentarem típicas:rampa e fundo ácidos (amarelos),com ou sem produção de H₂S.

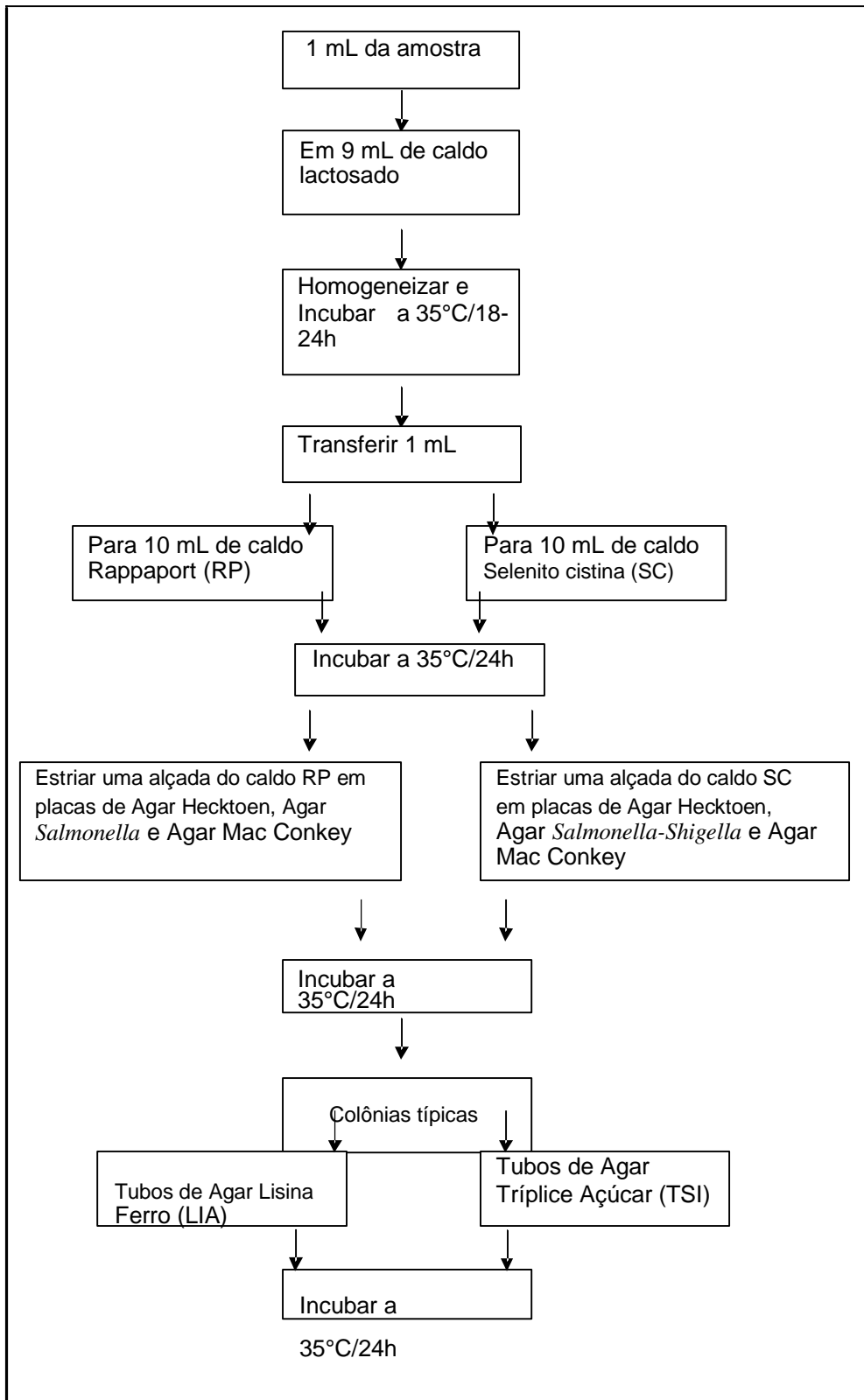
b) Reação típica de *Salmonella* em LIA

Fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do Agar). Reação atípica em LIA, que não deve ser descartada se as demais reações de TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S.

c) Testes bioquímicos

Fazer repiques do crescimento em TSI, onde se teve como resultado: rampa vermelha e fundo amarelo com ou sem H₂S para uma série de provas bioquímicas (Meio Rugai). Incubar a série bioquímica a 35°C/24 horas.

TABELA 4: Esquema demonstrativo para pesquisa de *Salmonella*



3.9 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. São cocos Gram positivo agrupados em cachos irregulares, imóveis, aeróbios e anaeróbios facultativos. Alguns são membros da microbiota normal da pele e das mucosas do corpo humano e animal, outros provocam supuração e formação de abscessos, uma variedade de infecções pirogênicas e até septicemia fatal. Amostras de estafilococos podem ser isoladas das vias aéreas superiores de portadores assintomáticos. Em animais do *S. aureus* causa mastite em vacas, ovelhas, cabras e ocasionalmente em outras espécies. O *S. aureus* também pode causar intoxicações alimentares no homem e em animais. O *Staphylococcus epidermidis* é um importante agente da endocardite e está envolvido em infecções genito-urinárias e em outras infecções como agente secundário. O *Staphylococcus saprophyticus* está relacionado com infecções do trato urinário. Os estafilococos são tradicionalmente divididos naqueles que são coagulase-positivo (são capazes de coagular o plasma humano ou de coelho) e aqueles que são coagulase-negativo. As amostras humanas coagulase-positivo são classificadas como *S. aureus* existindo subgrupos da espécie baseada na susceptibilidade a vários bacteriófagos. A identificação dos estafilococos coagulase-negativo em laboratório está limitada geralmente a duas espécies: *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Há vários métodos disponíveis para a contagem de *S. aureus*, com sensibilidade variável tanto em função das características seletivo-diferenciais utilizadas na formulação dos meios, como em função da técnica de contagem propriamente dita (direta em placas pelo Número Mais Provável). Existem diversos meios disponíveis para a contagem direta em placas, combinando uma ou mais características seletivo-diferenciais, como Agar Manitol Sal, o Agar Azida gema de ovo, etc. Atualmente tem sido mais utilizado o Agar Baird-Parker (BP) que combina o telurito de potássio (0,01%), a glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%) como agente seletivos e a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo, como características diferenciais (SILVA et al. 2007).

3.9.1 MATERIAL

Meios de culturas e reagentes:

Água Peptonada Tamponada; Agar Baird-Parker, tubos com plasma de coelho diluído 1:10; placas de Agar DNase; frasco com solução HCl 1N; tubo com soro fisiológico; bateria de gram.

Equipamentos e utensílios:

Estufa bacteriológica; zaragatoas(swabs)estéreis, lâminas de microscopia e alça de Drigalsky.

3.9.2 PROCEDIMENTO

ETAPA 1: Processamento da amostra

Retirar e pesar assepticamente 25 g da amostra e misturar com 225 mL de água peptonada 0,1% em homogeneizador estéril. Esta solução corresponderá à diluição 10^{-1} . Realizar as diluições apropriadas e transferir 0,1mL da amostra para as placas de Agar Baird-Parker,utilizando a técnica de “spread plate” e incubá-las a 37 ° por 24-48 horas.

ETAPA 2: Leitura e Interpretação 1

Agar Baird-Parker

Observar se houve crescimento, indicado pela presença de colônias na superfície do Agar, colônias circulares, pretas, pequenas (máximo 1,5mm em diâmetro), lisas, convexas, com bordas perfeitas massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca. Eventualmente,

colônias atípicas podem apresentar-se cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos.

ETAPA 3: Caracterização Morfológica

O simples crescimento em meio seletivo indicador não permite tirar qualquer conclusão quanto à morfologia bacteriana, havendo necessidade imediata de se comprovar a forma bacteriana do microorganismo bem como o tipo de agrupamento das células (cocos dispostos em cacho de uva). Isto é feito através da coloração.

Agar Baird-Parker

Dividir uma lâmina em 2 áreas. Colocar uma alça de soro fisiológico na 1ª área e fazer 1 esfregaço fino a partir da colônia de cor negra. Na 2ª área, colocar também uma alça de soro e fazer 1 esfregaço fino a partir da colônia cinza. Corar pelo método de gram. Após a observação microscópica anotar a forma bacteriana, tipo de agrupamento e reação tintorial.

ETAPA 4: Caracterização Fisiológica (provas de patogenicidade)

Objetivo: Comprovada a morfologia característica do gênero *staphylococcus*, são determinadas características fisiológicas inerentes ao grupo, através das provas de patogenicidade, que determinam a participação do microorganismo na etiologia e patologia das doenças humanas.

Prova de coagulase: havendo colônias BP - positivas, transferir algumas delas (5), para um tubo com plasma de coelho diluído 1:10, fazendo uma suspensão homogênea. Incubar a 37°C por 3 h. A leitura feita com mais de 3 horas de incubação, pode dar resultado falso-negativo. Para evitar tal causa de erro, os tubos, após este período serão mantidos a 4°.

Prova de DNase: semear com alça de platina, em movimentos circulares, três (3) colônias BP – positivas na superfície de uma placa de Agar DNase. Identificá-la a 37°C por 24 horas.

ETAPA 5: Leitura e Interpretação 2

Retirar o tubo de plasma de coelho da geladeira e a placa de Agar DNase da estufa;

Prova de coagulase: a prova se caracteriza pela formação de um coágulo firme. Em caso negativo o plasma continua líquido;

Prova de DNase: cobrir a superfície do meio com uma solução de HCL 1N. A prova positiva se caracteriza pela formação de um halo claro transparente, em torno do crescimento bacteriano e turvação do restante do meio pela degradação do DNA pelo HCl (hidrólise ácida). Na prova negativa, a turvação será observada também em redor do crescimento bacteriano, devido a não produção de DNase pelos microorganismos estando o DNA íntegro.

RESULTADO

Como diferenciar as espécies de estafilococos isolados de acordo com a tabela abaixo:

TABELA 5: Diferenciação das espécies *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>	Manitol	Coagulase	DNase
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	-	-

Fonte: Adaptado segundo dados da pesquisa.

4 METODOLOGIA

A metodologia aplicada para a elaboração da revisão bibliográfica foi à análise de artigos científicos, livros e publicações recentes. Para isso foram realizadas consultas a bancos de dados do SCIELO, PUBMED, MEDLINE, JPEN e revistas especializadas no assunto. A pesquisa foi realizada nos idiomas português, espanhol e inglês, utilizando as seguintes palavras-chaves: probioticos, bactérias probióticos, mecanismo de ação dos probióticos e propriedades dos probióticos.

5 CONCLUSÃO

O controle de qualidade é responsável pelo monitoramento da qualidade de todos os estágios da produção de alimentos funcionais, ou seja, participa de todas as atividades relacionadas à qualidade final dos produtos. Por este motivo, a matéria-prima, por ser considerada uma quantidade representativa das formulações, levando-se em consideração seu amplo uso e suas características propícias ao crescimento microbiano, deve passar por um monitoramento rigoroso. Com relação à qualidade microbiológica de probióticos, a empresa que fornece este tipo de matéria-prima deve obedecer a parâmetros específicos de cada etapa de produção, buscando assim evitar futuras contaminações e garantir que realmente está sendo comercializadas cepas puras, livre de outros tipos de microorganismos e até mesmo de microorganismos patogênicos. Portanto, para que exista um controle de qualidade rígido e operante para a mais importante matéria-prima da indústria de alimentos probióticos, é de suma importância a implantação de procedimentos padronizados de análises microbiológicas embasadas em literaturas confiáveis e executadas por profissionais plenamente capacitados e treinados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERBERTH I. **Estabelecimento da microflora intestinal normal do recém nascido.** In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal.** Vevey. Suíça: Nestlé Nutrition Services; 1998. p.7-10.

AMARETTI, A.; BERNARDI, T.; TAMBURINI, E.; ZANONI, S.; LOMMA, M.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. **Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 73, n. 11, p. 3637–3644, 2007.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). **Position of the American Dietetic Association: Functional Foods.** Journal of American Dietetic Association, v. 104, n. 5, p.814-826, 2004.

ANVISA. **Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002.

ARAUJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina.** 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, 2007.

ARROYO, Ana Estela Gamiño. **Flora Normal, Probióticos y Salud Humana.** Acta Universitaria. Vol.15, setembro-dezembro 2005. (p.34-36).

ARVOLA, T.; LAIHO, K.; TORKKELI, S.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S.; MAUNULA, L.; ISOLAURI, E. **Prophylactic *Lactobacillus* GG Reduces Antibiotic-Associated Diarrhea in Children With Respiratory Infections: A Randomized Study.** Pediatrics, v. 104; n. 5; p. 1121-1122; 1999.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C.; **Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – PARTE 1 .NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição – Ipatinga: Uni leste, V. 2 – N. 3 – Ago./Dez. 2008.**

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S. F. **Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria.** *Journal Dairy Science*, Lancaster, v. 79,p. 8-15, 1996.

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.

BORBA LM. FERREIRA CLLF. **Probióticos em bancos de leite humano. In: Ferreira CLLF.Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção.** Viçosa: UFV; 2003. p.103-22.2.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. **The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002.** *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 78, n. 4, p. 675-683, 2003.

BRANDT,K.G.et al **.Importância da microflora intestinal.**Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,Pediatria (São Paulo) 2006;28(2):117-27.

BRASIL. **Portaria n.398, de 30 de abril de 1999.** Fornece definição legal de alimento funcional. Brasília, ANVISA, 1999.

BRASIL. Resolução n.18 e n.19 de 30 de abril de 1999. **Aprova regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Brasília, ANVISA, 1999.

BRASIL. Resolução n.19 de 30 de abril de 1999. **Aprova regulamento técnico de procedimento para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem.** Brasília, ANVISA, 1999.

CARVALHO G. **Nutrição, probióticos e disbiose.** Disponível em: <<http://www.nutconsult.com/artigos.htm>> Acesso em 04 Jan. 2011.

CASTILHO AC, CUKIER C, MAGNONI D. **Probióticos no câncer.** IMEN – Instituto de Metabolismo e Nutrição; 2006. Disponível em: < http://www.nutricaoclinica.com.br/index.php?Searchword=disbiose+intestinal&option=com_search&itemid=23>. Acesso em 02 Jan. 2011.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. **Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods.** *Int. J. Dairy Technol.*, Long anborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

COPPOLA M.M, TURNES G.C. **Probióticos e resposta imune.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. **Packaging system and probiotic dairy foods.** *Food Research International*, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

DE ROSS, N.M.; KATAN, M.B. **Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998.** *Am J Clin Nutr*; vol.71, p.405-11, 2000.

FALONY, G.; VLACHOU, A.; VERBRUGGHE, K.; VUYST, L. D. **Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* bb536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose.** *Applied And Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 12, p. 7835–7841, 2006.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. (p.146-151).

FOX, S. M. **Probiotics: intestinal inoculants for production animals.** Veterinary Medicine, Lenexa, v. 83, n. 8, p. 806-830, 1988.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals.** J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

FRIEDMAN, G. **Probiotic, prebiotic and comensal bacteria perspectives and clinical application in gastroenterology.** Gastroenterology Clinics of North America, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 12-16, 2005.3) Supplement Watch – Lactobacillus acidophilus.

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

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. **Gut flora in health and disease.** Lancet, v. 360, p.512-518, 2003.

GUERIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYLIT, O.; ANDRIEUX, C. **Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants.** American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 111-117, 1998.

Guias práticas da OMGE. **Probióticos e prebióticos.** Maio de 2008.

GOMES, P. M. A., MALCATA, X. F. **Agentes probióticos em alimentos, aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicação tecnológica.** Boletim de Biotecnologia, Lisboa, n. 64, p.12-22, dez. 1999.

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. **The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers.** European Journal of Pediatrics, Berlin, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. **The production, application and action of lactic cheese starter cultures.** In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC Press, 1999. p.99-131.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. **Probiotics.** Best Practice Research Clinical Gastroenterology, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JELEN, P.; LUTZ, S. **Functional milk and dairy products.** In: MAZZA, G. (Ed.). **Functional foods: biochemical and processing aspects.** Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 357-81.

LAJOLA, F.M.A **Alimentos Funcionais: uma visão geral.** In DE ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia de nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas.** São Paulo: ed. Atheneu, 2001.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. **The coming age of probiotics.** Trends Food Sci. Technol., Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LILLY DM, STILLWELL RH. **Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms.** Science 1965;147:747-8.

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

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. **Microbial-gut interactions in health and disease.** **Prebiotics.** Best Practice Research Clinical Gastroenterology, v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.

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, Oxford, v. 140, n. 3, p. 417–426, 2005.

MEULEN, R. V. D.; MAKRAS, L.; VERBRUGGHE, K.; ADRIANY, T.; VUYST, L. D. **In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteróides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 72, n. 2, p. 1006–1012, 2006.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOURA, M. R. L. **Alimentos Funcionais: seus benefícios e a legislação.** [S.l.:s.n.],2005.Disponível : <<http://acd.ufrj.br/consumo/leituras/ld.htm#leituras>> . Acesso em: 07 Jan. 2011.

MUSTAPHA, A.; JIANG, T.; SAVAIANO, D. A. **Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*.** Journal of Dairy Science, Champaign, v. 80, n. 8, p. 1537-1545, 1997.

NICOLI JR. et al., **Probióticos: moduladores do ecossistema digestivo.** In: Mendonça RCS, editor. **Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo.** Viçosa: UFV; 2003. (209p.).

NOVALES, Maria Guadalupe Miranda. **Probióticos y Micronutrientes ¿Son útiles para el tratamiento de la diarrea aguda?** Medigraphic Artemisa. Vol.65, maio-junho 2008. (p.158).

OLIVEIRA, Maricê Nogueira de (et.al.). **Aspectos Tecnológicos de Alimentos Funcionais Contendo Probióticos.** RBCF (Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas). vol. 38, n.1,jan./mar,2002.

OSMAN, N.; ADAWI, D.; MOLIN, G.; AHRNE, S.; BERGGREN, A.; JEPSSON, B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of Oligofructose and Inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *Gastroenterology*, Philadelphia, v. 6, n. 31, p. 1-10, 2006.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *Microbiology*, Edinburgh, v. 7, n. 86, p. 1-9, 2007.

PEDROSA, M. C.; GOLNER, B. B.; GOLDIN, B. R.; BARAKAT, S.; DALLAL, G. E.; RUSSEL, R. M. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 61, n. 2, p. 353-359, 1995.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALENTEY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. *Food Aust.*, Sydney, v.49, n.10, p.471-475, 1997.

SAAD, Susana Marta Isay. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* .Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SANTOS, Anna Carolina Accioly Lins. **Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal.** Monografia apresentada como conclusão do curso de Especialização em Terapia Nutricional. Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 3 .ed. São Paulo: Varela, 2007.

SIMHON,A.;DOUGLAS,J.R;DRASAR,B.S;JOOHILL,J.F.**Effect of feeding on infants faecal flora.**Arch Dis child;vol.57.p.54-8,1982.

SOZZI, T.; SMILEY, M. B. **Antibiotic resistences of yogurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 40, n. 5, p. 862-865, 1980.

SURAWICZ, C. M.; MCFARLAND, L. V.; GREENBERG, R. N.; RUBIN, M.; FEKETY,R.; MULLIGAN, M. E.; GARCIA, R. J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.;ELMER, G. W. **The Search for a Better Treatment for Recurrent *Clostridium difficile* Disease: Use of High-Dose Vancomycin Combined with *Saccharomyces boulardii*.** Clin.Infect. Dis., v. 31, p. 1012-1017, 2000.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. **Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico.** Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 26, n. 3, p. 589-595,2006.

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.

VERMELHO, A. B. et al.**Práticas de Microbiologia.**1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.2006.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. **Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products.** *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.10, p.271-275,2000.

ANEXO A - Laudo de análise microbiológica dos probióticos

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Amostra:

Data da coleta:

Responsável:

1) CONTAGEM DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

- Contagem e resultados

Data da incubação:					Horas:				Data da leitura:		
AMOSTRA	DILUIÇÕES								CÁLCULOS	OBSERVAÇÕES E RESULTADOS	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			

2) MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTAIS E FECAIS, STAPHYLOCOCCUS, SALMONELLA E E. COLI.

- Contagem e resultados

Data da incubação:		Horas:			Data da leitura:	
AMOSTRA	DILUIÇÕES			OBSERVAÇÕES E RESULTADOS		
	10 mL	1mL	10 ⁻¹ mL			
Teste Presuntivo						
Teste confirmativo e coliformes Fecais						

AMOSTRA	RESULTADO		OBSERVAÇÕES E RESULTADOS
	PRESENÇA	AUSÊNCIA	
Teste <i>Staphylococcus</i>			
Teste <i>Salmonella</i>			

Teste *E. coli*

- LIMITES DE ACEITAÇÃO:

Contagem de 10⁹ UFC/ml para microorganismos probióticos.

Ausência de Coliformes totais e fecais, *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* em 100ml.

ANALISTA RESPONSÁVEL
LIBERAÇÃO

RESPONSÁVEL PELA

ANEXO B – Tabela de número mais provável (NMP) para análise de Coliformes

Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf.lim.	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<1.8	--	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120

2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
	3	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--

ANEXO C -

Imagem 1 - Laboratório de controle de qualidade microbiológico



