

## Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas

Ana M. P. Gomes e F. Xavier Malcata\*

Escola Superior de Biotecnologia,  
Universidade Católica Portuguesa  
Rua Dr. António Bernardino de Almeida,  
4200-072 Porto

\* Autor a quem deverá ser enviada toda a correspondência

**Palavras-chave:** bifidobactérias, *Lactobacillus acidophilus*, probióticos, saúde, lacticínios

### Introdução

As culturas probióticas são suplementos microbianos que aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos. De entre os diversos géneros que integram este grupo, destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, e, em particular, a espécie *Lactobacillus acidophilus*. A sua utilização como aditivo em diversos produtos lácteos tem sofrido enormes progressos durante a última década, na sequência de um conjunto diversificado de trabalhos científicos nas áreas de taxonomia, ecologia e terapêutica das referidas espécies em países tão variados como o Japão, a Dinamarca, a Alemanha, a Polónia, a Rússia, o RU e os EUA (Reuter, 1990). Para além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde que proporcionam, as culturas probióticas podem também contribuir para melhorar o sabor do produto final, possuindo a vantagem de promover uma acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento. As várias publicações e patentes foram revistas pela primeira vez por Rasic e Kurmann (1983), numa obra que se tornou hoje uma referência obrigatória. O número de patentes têm entretanto aumentado significativamente, incluindo hoje em dia uma gama alargada de aplicações relativas ao desenvolvimento de novos produtos

nutracêuticos e à produção de culturas de arranque.

### Definição

O termo 'probiótico', de origem grega, significa 'para a vida', e tem sido empregue das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. Tal termo foi inicialmente proposto como descritivo de compostos ou extractos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (Lilly e Stillwell, 1965); posteriormente, Parker (1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Esta definição era, no entanto, pouco satisfatória

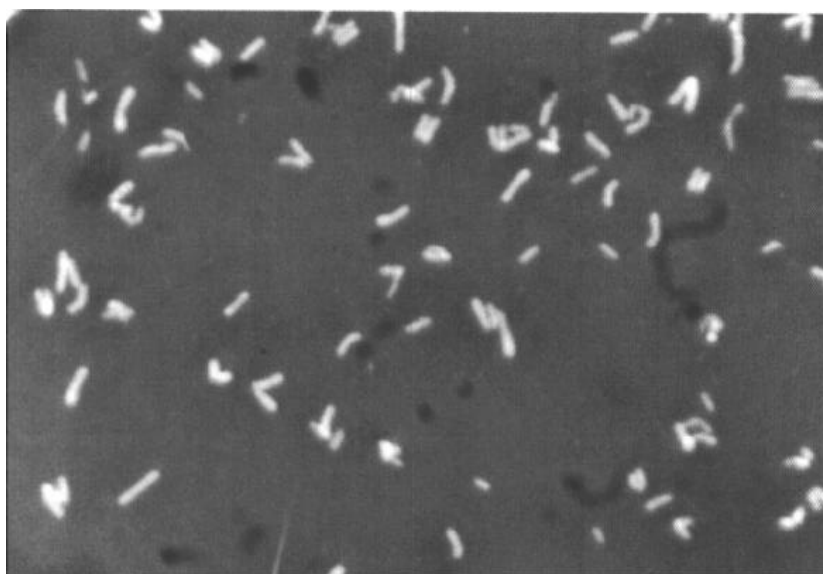
uma vez que a palavra 'substância' poderia incluir suplementos tais como antibióticos (cuja função é virtualmente oposta).

A definição de probiótico foi alargada já na presente década, não tendo até à data sofrido qualquer alteração (Havenaar e Huis in't Veld, 1992): os agentes probióticos são então definidos como "microorganismos 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 ingestão, devido à melhoria das propriedades da microflora indígena".

### Aspectos fisiológicos

#### Género *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier, sendo, em geral, caracterizadas por serem microorganismos gram-positivos, não formadores de esporos,



**Figura 1.** Fotomicrografia de *Bifidobacterium lactis* cultivado em MRS agar durante 24 horas a 37 °C, que aparecem caracteristicamente como bacilos bifurcados ramificados.

**Tabela 1.** Lista das espécies (por ordem alfabética) que integram os géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

<i>Lactobacillus</i>		<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. jensenii</i> <sup>a</sup>	<i>B. adolescentis</i> <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i> <sup>a</sup>	<i>L. johnsonii</i>	<i>B. angulatum</i> <sup>a</sup>
<i>L. agilis</i>	<i>L. kandleri</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. kefir</i>	<i>B. asteroides</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>B. bifidum</i> <sup>a</sup>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. malefermentans</i>	<i>B. boum</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. mali</i>	<i>B. breve</i> <sup>a</sup>
<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. minor</i>	<i>B. catenulatum</i> <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> <sup>a</sup>	<i>L. murinus</i>	<i>B. choerinum</i>
<i>L. buchneri</i> <sup>a</sup>	<i>L. oris</i> <sup>a</sup>	<i>B. coryneforme</i>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> <sup>a</sup>	<i>L. parabuchneri</i> <sup>a</sup>	<i>B. cuniculi</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. paracasei</i> <sup>a</sup>	<i>B. dentium</i> <sup>a</sup>
<i>L. confusus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>B. gallicum</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. pontis</i>	<i>B. gallinarum</i>
<i>L. crispatus</i> <sup>a</sup>	<i>L. plantarum</i> <sup>a</sup>	<i>B. globosum</i> <sup>a</sup>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. reuteri</i> <sup>a</sup>	<i>B. indicum</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rhamnosus</i> <sup>a</sup>	<i>B. infantis</i> <sup>a</sup>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. ruminis</i>	<i>B. lactis</i>
<i>L. fermentum</i> <sup>a</sup>	<i>L. sake</i>	<i>B. longum</i> <sup>a</sup>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. salivarius</i> <sup>a</sup>	<i>B. magnum</i>
<i>L. fructosus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>B. merycicum</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. sharpeae</i>	<i>B. minimum</i>
<i>L. gasserii</i> <sup>a</sup>	<i>L. suebicus</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i> <sup>a</sup>
<i>L. graminis</i>	<i>L. vaccिनostercus</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>L. halotolerans</i>	<i>L. vaginalis</i> <sup>a</sup>	<i>B. pullorum</i>
<i>L. hamsteri</i>	<i>L. viridescens</i>	<i>B. ruminantium</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>B. saeculare</i>
<i>L. hilgardii</i>		<i>B. subtile</i>
<i>L. homohiochii</i>		<i>B. suis</i>
<i>L. intestinalis</i>		<i>B. thermophilum</i>

<sup>a</sup> espécies isoladas de fonte humana

desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios (Sgorbati *et al.*, 1995). No que diz respeito à sua morfologia, podem ter várias formas que incluem bacilos curtos e curvados, bacilos com a forma de cacete e bacilos bifurcados (Figura 1). Actualmente, o género *Bifidobacterium* inclui 30 espécies,

10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado; esta última tem a particularidade de apresentar uma boa tolerância ao oxigénio, ao contrário da maior parte das outras do mesmo género (Tabela 1). As bifidobactérias estão inseridas

na ordem das actinomicetas, dentro do grupo das bactérias gram-positivas (Sgorbati *et al.*, 1995), e são caracterizadas por um conteúdo elevado de guanina e citosina que varia, em termos molares, de 54 a 67 % (Tabela 2); possuem também algumas diferenças notáveis ao nível das propriedades fisiológicas e bioquímicas, incluindo os constituintes da parede celular (Tabela 2). São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO<sub>2</sub>, excepto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfoctolase, a qual pode por isso ser usada como marcador taxonómico na identificação do género, mas que não permite a diferenciação entre as espécies.

Além da glucose, todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono. Um estudo recente, que avaliou 290 estirpes de 29 espécies de bifidobactérias de origem animal ou humana (Crociani *et al.*, 1994), apontou a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar hidratos de carbono complexos. Os substratos fermentados pela maior parte das espécies foram D-galactosamina, D-glucosamina, amilose e amilopectina. A *Bifidobacterium infantis* foi a única espécie capaz de fermentar o ácido D-glucurónico, enquanto que estirpes de *B. longum* fermentaram a arabinogalactana, bem como as gomas arábica, ghatti e tragacantha.

A gama de temperaturas para a qual se regista crescimento óptimo oscila entre os 37 e 41 °C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45 °C e 25-28 °C, respectivamente. Em relação ao pH, o óptimo verifica-se a valores de pH entre 6 e 7, com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4.5-5.0 ou a valores de pH alcalinos de 8.0-8.5. Pormenores específicos acerca da sua fisiologia

**Tabela 2.** Características fisiológicas e bioquímicas seleccionadas de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus*.

Característica	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Fisiologia	Anaeróbio	Microaerófilico
Composição da parede celular:		
Tipo de peptidoglicano	Amino ácido básico no tetrapeptídeo variável, ou ornitina ou lisina, vários tipos de transpeptidação	Lys-D Asp
Composição fosfolípido/Ácido teicoico	Poliglicerolfosfolípido e seus liso-derivados, alanilfosfatidilglicerol, liso-derivados de difosfatidilglicerol	Glicerol
Composição base DNA Mol % guanina+citosina	55-67	34-37
Configuração ácido láctico	L	DL
Metabolismo de açúcares	Heterofermentativo	Homofermentativo

(Adaptado de: Kurmann e Rasic, 1991; Mital e Garg, 1992)

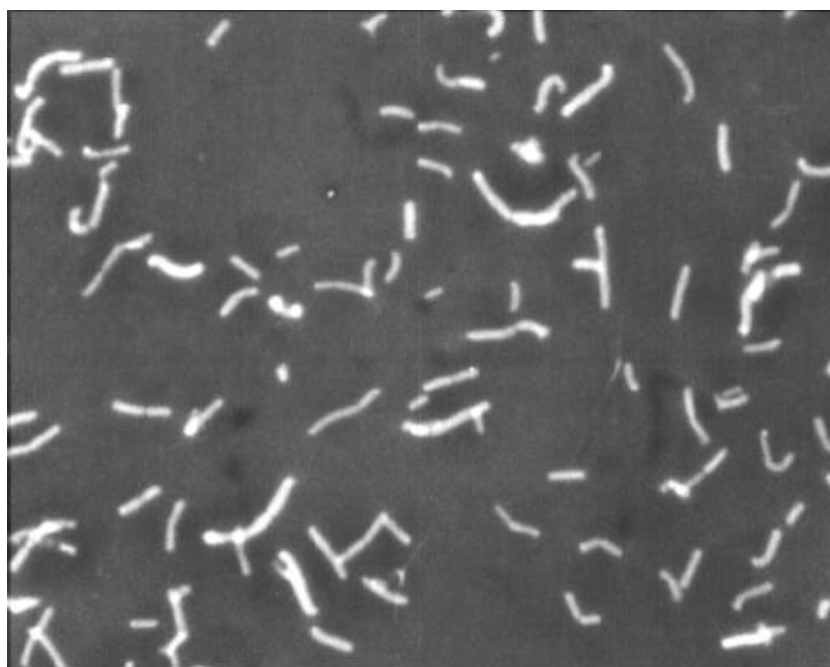
foram extensamente revistos nos trabalhos de Rasic e Kurmann (1983) e Sgorbati *et al.* (1995).

## Género *Lactobacillus*

Outro dos géneros que integra o mundo dos agentes probióticos é o *Lactobacillus*, isolado pela primeira vez por Moro (1900) a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno; este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. Estes microorganismos são geralmente caracterizados como gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e aerotolerantes ou anaeróbios. O género compreende, neste momento, 56 espécies oficialmente reconhecidas (Tabela 1); as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. O *L. acidophilus*, o mais comum, é um bacilo gram-positivo com pontas arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou

em cadeias curtas (Figura 2), com tamanho típico de 0.6-0.9 µm de largura e 1.5-6.0 µm de comprimento. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio, e ser microaerófilico, com o crescimento em meios sólidos favorecido por

anaerobiose ou pressão reduzida de oxigénio. As principais características fisiológicas e bioquímicas desta espécie de microorganismos constam da Tabela 2. Uma grande parte das estirpes de *L. acidophilus* degradam amígdalina, celobiose, frutose, galactose,



**Figura 2.** Fotomicrografia de *Lactobacillus acidophilus* cultivado em TGV agar durante 24 horas a 37 °C.

glucose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (Nahaisi, 1986). Os dados disponíveis apontam para uma melhor utilização da sucrose do que da lactose por parte de *L. acidophilus*, um comportamento atribuído a diferenças nas actividades da  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) e da  $\beta$ -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26): de facto, enquanto a primeira é uma enzima constitutiva do *L. acidophilus*, a segunda pode ser induzida (Nielsen e Gilliland, 1992). Como microorganismo heterofermentativo, produz quase exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glucose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (à taxa de 1.8 mol por mol de glucose), embora também possa produzir algum acetaldeído; este último também pode ser proveniente do metabolismo de compostos azotados (p.ex. treonina), uma vez que *L. acidophilus* exhibe uma elevada actividade de treonina aldolase (Marshall e Cole, 1983).

As condições óptimas para a sua multiplicação eficaz são temperaturas de 35-40 °C e valores de pH de 5.5-6.0. Deve salientar-se que o crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer a 45 °C, e que a sua tolerância em termos de acidez do meio varia entre 0.3 e 1.9 % (v/v) de acidez titulável.

## Ecologia

As bifidobactérias são bactérias de extrema importância no complexo ecossistema activo no tracto gastrointestinal do ser humano e de outros mamíferos, e também em abelhas (Sgorbati *et al.*, 1995). Tais bifidobactérias estão distribuídas por diversos nichos ecológicos, sendo a razão em que eles se encontram dependente da idade e da dieta alimentar.

As bifidobactérias dominam a microflora indígena dos recém-nascidos, sendo a sua proliferação estimulada pelos componentes glicoproteicos da  $\kappa$ -caseína. A proporção numérica diminui com o

avanço da idade, acabando por estabilizar no terceiro lugar da lista dos géneros mais abundantes (o que corresponde a ca. 25% da flora intestinal total), depois dos géneros *Bacteroides* e *Eubacterium* (Finegold *et al.*, 1983). Registam-se igualmente alterações nos perfis das espécies constituintes ao longo da vida, uma vez que o *B. infantis* e o *B. breve*, típicos dos recém-nascidos, são substituídos nos adultos pelo *B. adolescentis*. O *B. longum* é uma espécie que perdura ao longo de toda a vida do hospedeiro: por esse facto, esta espécie é a mais procurada para integrar alimentos funcionais (Mitsuoka, 1990). O referido perfil depende também da composição da dieta alimentar em termos de factores bifidogénicos (p.ex. fibras bifidogénicas), conjugada com a própria fisiologia do hospedeiro.

Os lactobacilos estão distribuídos por vários nichos ecológicos espalhados pelos tractos gastrointestinal e genitourinário, constituindo, de forma semelhante às bifidobactérias, uma fracção importante da microflora natural. Tal distribuição é afectada por vários factores ambientais, incluindo o pH, a disponibilidade de oxigénio, o nível de substratos específicos e a presença de secreções e interacções bacterianas (Salminen *et al.*, 1996).

Em qualquer um dos dois géneros (i.e. *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*), as espécies correntemente utilizadas ao nível tecnológico são não-patogénicas, gozando do status GRAS (Generally Recognised As Safe).

## Crescimento em leite

As espécies que integram o género *Bifidobacterium* conseguem proliferar num meio semi-sintético contendo apenas lactose, alguns aminoácidos (i.e. cisteína, glicina e triptofano), vitaminas, nucleótidos e alguns minerais (Hassinen *et al.*, 1951). Um dos factores limitantes do seu crescimento é a fonte de azoto, que para algumas estirpes poderá

estar na forma de amónia enquanto para outras estirpes deverá ser uma fonte orgânica (Rasic e Kurmann, 1983).

No que diz respeito ao *L. acidophilus*, os requisitos em nutrientes necessários para a exibição de taxas razoáveis de crescimento são semelhantes aos anteriormente referidos para *Bifidobacterium*: hidratos de carbono como fonte de energia, proteínas e respectivos produtos de degradação, vitaminas do complexo B, derivados dos ácidos nucleicos e minerais (p.ex. magnésio, manganésio e ferro) (Mital e Garg, 1992). A presença de um número elevado de grupos sulfidrilo em leites enriquecidos com proteínas do soro favorece o crescimento de *L. acidophilus*, enquanto que a peptona e a tripsina estimulam a produção de ácido (Kurmann, 1988). A adição de sumo de tomate (como fonte de açúcares simples, minerais e vitaminas do complexo B) a leite magro revelou ser útil, tanto na promoção de um melhor crescimento de *L. acidophilus* (i.e. contagens microbianas mais elevadas e tempos de duplicação mais curtos) como na obtenção de uma maior actividade fermentativa (i.e. melhor degradação dos açúcares e valores de pH mais baixos) (Babu *et al.*, 1992).

Embora o leite seja o meio de cultura preferencial para o crescimento destes microorganismos, com o objectivo de obter um produto de qualidade, em termos de textura e de viabilidade, é bem conhecido o fraco poder de propagação destas espécies naquela matriz. Apesar de ser um alimento altamente nutritivo, que contém todos os nutrientes essenciais, o leite não possui aminoácidos livres nem peptídeos em concentrações suficientes (i.e. ca. 0.1 g/L) ou na forma correcta, susceptível de permitir o crescimento dos microorganismos em causa (Rasic e Kurmann, 1983; Gomes *et al.*, 1998a). Um estudo recente, que envolveu a comparação entre diferentes tipos de leite (vaca, cabra e ovelha) com o intuito de avaliar a influência do substrato sobre estirpes

probióticas seleccionadas, evidenciou que os teores proteico e vitamínico mais elevados do leite de ovelha não desempenharam papel importante conducente a um crescimento adequado de *B. lactis* (Gomes e Malcata, 1998b). Além disso, a presença de elevadas concentrações de ácidos gordos livres de cadeia média em leite de cabra conduziu à inibição do crescimento de *L. acidophilus*. A solução sugerida por diversos investigadores (Roy *et al.*, 1990; Klaver *et al.*, 1993; Ventling e Mistry, 1993; Gomes e Malcata, 1998b; Gomes *et al.*, 1998a) foi a inclusão de determinados compostos no leite, p.ex. fontes específicas de azoto, e que englobam, fundamentalmente, dois grupos de compostos distintos: factores bifidogénicos e factores de crescimento.

## Factores bifidogénicos e factores de crescimento

Os factores bifidogénicos são compostos, geralmente hidratos de carbono, susceptíveis de resistir ao metabolismo directo do hospedeiro, e que por isso atingem o intestino onde são metabolizados preferencialmente pelas bifidobactérias. Tais factores podem ser incluídos no novo

conceito de prebiótico, designação utilizada para os ingredientes não digeríveis, mas que afectam de modo benéfico o hospedeiro através do desencadear de crescimento e/ou exibição de actividade selectiva em relação a um número limitado de bactérias do intestino capazes de contribuir beneficemente para a saúde (Gibson e Roberfroid, 1995). Em contrapartida, os factores de crescimento promovem a multiplicação das bifidobactérias *in vitro*, mas não podem ser transportados por vias naturais até ao intestino onde poderiam promover a proliferação selectiva das bifidobactérias (Modler, 1994). A Tabela 3 sumaria algumas das fontes e aplicações mais comuns destes dois grupos de compostos relevantes para as bifidobactérias.

Os factores bifidogénicos mais utilizados são os fruto-oligossacáridos (FOS) de ocorrência natural (p.ex. na soja, trigo, milho, cebola e espargos), ou produzidos industrialmente a partir de xarope de sucrose; trata-se de frutanos com ligação  $\beta(2\rightarrow1)$ , tipicamente polidispersos com graus de polimerização que podem variar entre 2 e 35. De entre os diversos FOS estudados, a oligofrutose mostrou o efeito bifidogénico mais intenso; no entanto, a inulina também

tem encontrado um sucesso significativo, bem como os xilooligossacáridos de origem natural e os transgalacto-oligossacáridos de origem sintética.

No que diz respeito aos factores de crescimento, os derivados do leite bovino e humano são considerados potenciais candidatos para assegurar um eficaz crescimento *in vitro* das bifidobactérias (Tabela 3). Os hidrolisados preparados a partir da caseína (Proulx *et al.*, 1994) ou a partir do próprio leite (Gomes *et al.*, 1998a) são bons exemplos, pois representam uma flexível fonte de aminoácidos livres e peptídeos de diversos pesos moleculares, dependendo do grau de hidrólise providenciado.

## Valores nutritivo e terapêutico

A constatação de efeitos probióticos de aditivos bacterianos viáveis data de há muitos anos e tem variado, ao longo do tempo, em função do conhecimento em diferentes momentos. No princípio do século XX, Tissier defendia que as bifidobactérias eram importantes para a saúde e nutrição das crianças, incluindo os recém-nascidos afectados por diarreias; tal efeito era atribuído à capacidade das bifidobactérias removerem as bactérias putrefactivas responsáveis pelas desordens gástricas, e de se restabelecerem ecologicamente como microorganismos intestinais dominantes. Pouco depois, Metchnikoff atribuiu propriedades mágicas ao iogurte, capaz de desencadear uma longevidade duradoura, alegando que o consumo regular de grandes quantidades de iogurte contendo espécies de *L. acidophilus* resultava numa capacidade alargada de controlo de infecções por agentes patogénicos entéricos, associada ao controlo da toxemia crónica natural, a qual tem um papel fundamental no envelhecimento e, conseqüentemente, na mortalidade.

**Tabela 3.** Lista de possíveis factores bifidogénicos e factores de crescimento para *Bifidobacterium* spp.

Factores bifidogénicos	Factores de crescimento
Oligossacáridos transgalactosilados, (Galactosil galactose, galactosil glucose)	Hidrolisado de $\kappa$ -caseína
Frutooligossacáridos (inulina, oligofrutose)	Macropeptídeo de caseína
Lactulose	Factor bifido de caseína (hidrólise por papaína)
Glucosil-inositol	Alginatos despolimerizados
Xilooligossacáridos (xilobiose)	Hidrolisados de caseína
2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona	Hidrolisados de leite

Durante as últimas décadas, as propriedades nutritivas e terapêuticas de alimentos funcionais incorporando bactérias probióticas têm sido alvo de atenção considerável; numerosas conclusões relatadas na literatura científica constam dos trabalhos de revisão de Marteau e Rambaud (1993) e de Yaeshima (1996), estando resumidos na Tabela 4. No entanto, alguns dos resultados obtidos são altamente variáveis e por vezes inconsistentes, o que dificulta o estabelecimento, de forma clara e inequívoca, de um determinado benefício para a saúde. Têm-se verificado grandes

progressos e considerável empenho na organização de estudos sobre bactérias probióticas, nomeadamente através de ensaios cuidadosamente planeados, randomizados e controlados por placebo (para assim poder converter pretensões em factos cientificamente comprovados) (Saxelin *et al.*, 1995).

**Valor nutritivo**

Os alvos de estudo mais comuns na avaliação do valor nutritivo de estirpes probióticas são os lacticínios fermentados por lactobacilos e

bifidobactérias. Tais produtos contêm um elevado teor de nutrientes, que variam com o tipo de leite utilizado, o tipo de microorganismo adicionado e o processo de fabrico escolhido. A contribuição das bifidobactérias para o aumento do valor nutritivo destes alimentos está sintetizada na Tabela 4. De uma forma geral, tais efeitos, i.e. o aumento da digestibilidade das proteínas e gorduras, a redução do conteúdo em lactose (a qual assume particular importância para os indivíduos com intolerância à lactose, devido a deficiência congénita em  $\beta$ -galactosidase ou a redução da actividade daquela durante desordens intestinais), a absorção acrescida de cálcio e ferro, o equilíbrio de conteúdo em várias vitaminas e a presença de alguns metabolitos secundários, acoplados à presença de células probióticas viáveis, fazem dos leites fermentados um dos alimentos naturais mais valiosos recomendados para o consumo humano (Rasic e Kurmann, 1983).

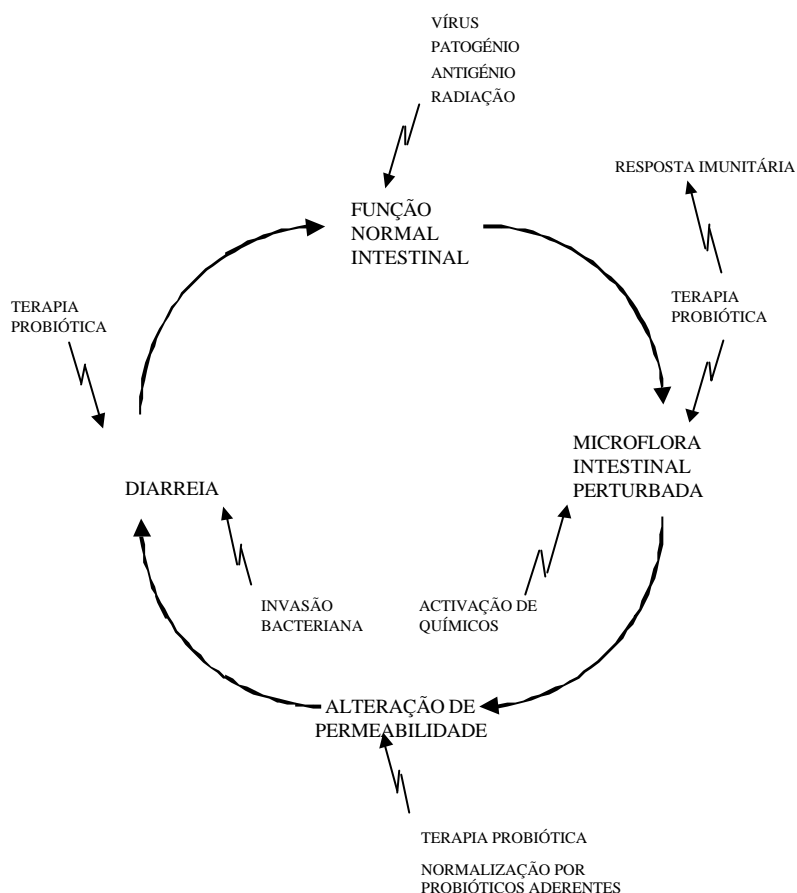
**Tabela 4.** Potenciais valores, nutritivo e terapêutico, de alimentos funcionais contendo agentes probióticos

<b>Efeito benéfico</b>	<b>Possíveis causas e mecanismos</b>
Melhor digestibilidade	Degradação parcial de proteínas, lípidos e hidratos de carbono
Melhor valor nutritivo	Níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos, p.ex. metionina, lisina e triptofano
Melhor utilização da lactose	Níveis reduzidos de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase
Ação antagonica contra agentes patogénicos entéricos	Distúrbios tais como diarreia, colite mucosa, colite ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica controlada pela acidez, inibidores microbianos (i.e. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , bacteriocinas e sais biliares) e inibição da adesão e activação dos patogénios (p.ex. consumo de ferro)
Colonização do intestino	Sobrevivência no ácido gástrico, resistência à lisozima e à tensão superficial baixa do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, modulação imunitária
Ação anticarcinogénica	Conversão de potenciais précarcinogénicos em compostos menos perniciosos  Ação inibitória perante alguns tipos de cancro, p.ex. cancro do trato gastrointestinal por degradação dos précarcinogénicos, redução das enzimas promotoras de carcinogénicos e estimulação do sistema imunitário
Ação hipocolesterolémica	Produção de inibidores da síntese de colesterol  Utilização do colesterol por assimilação e precipitação com sais biliares desconjugados
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras e $\gamma$ -interferão

**Valor terapêutico**

**Inibição de infecções intestinais**

Um dos valores terapêuticos atribuídos às bactérias probióticas, o qual está alicerçado em mecanismos de acção bem estabelecidos e sobejamente reconhecidos pela comunidade científica, é o efeito benéfico sobre distúrbios e infecções intestinais. O epitélio intestinal desempenha um papel de fronteira e barreira imunológica, estabelecendo a interface entre o conteúdo luminal e as células imunológicas subepiteliais. Qualquer perturbação a esta barreira, desencadeada por antigénios dietéticos, microorganismos patogénicos, agentes químicos ou radiações, conduz a um aumento da permeabilidade intestinal e a alterações estruturais no epitélio, as quais podem ocasionar aumento do fluxo de antigénios e provocar diversos tipos de inflamação. O uso



**Figura 3** Alterações que ocorrem durante distúrbios intestinais, e alvos potenciais de tratamento e prevenção (adaptado de Salminen *et al.*, 1996).

eficaz dos agentes probióticos nestas situações é justificado, não só no tratamento mas também na prevenção de tais alterações (ver Figura 3). São vários os trabalhos de revisão (Marteau e Rambaud, 1993; Salminen *et al.*, 1996) que documentam o uso destes agentes para o tratamento de desordens intestinais, p.ex. diarreia aguda por rotavírus em crianças e doenças inflamatórias intestinais, associados em alguns casos, à existência de cancro do cólon. Os mecanismos básicos desencadeados por estes agentes probióticos estão descritos na Tabela 4 e representados na Figura 3.

#### Outras propriedades

Diversos estudos sugerem que os agentes probióticos podem estar associados à carcinogénese intestinal. Esta situação clínica é mediada por enzimas bacterianas fecais, que activam os compostos procarcinogénicos em compostos

carcinogénicos. Ensaios clínicos realizados por diversos investigadores (Kurmann e Rasic, 1991; Mital e Garg, 1992; Marteau e Rambaud, 1993) em modelos animais evidenciaram que algumas estirpes de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* possuem a capacidade de reduzir os níveis daquelas enzimas, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de tumores. O efeito benéfico tem sido atribuído à mudança favorável que a ingestão de bactérias probióticas desencadeia na composição da flora intestinal. Um estudo recente com *Lactobacillus casei* (estirpe Shirota) permitiu tirar conclusões sobre o seu potencial na área de ‘prevenção alimentar’ do cancro; Morotomi (1996) afirmou que a administração parenteral desta estirpe provocou efeitos em termos do aumento da actividade imunológica e consequentes implicações na actividade antitumoral.

Outros efeitos benéficos de estirpes probióticas, mas que estão consubstanciados em estudos ainda controversos, incluem o efeito hipocolesterolémico, segundo mecanismos descritos na Tabela 4 (Tahri *et al.*, 1997). Alguns estudos referem também a ocorrência de uma melhor resposta imunológica após administração de agentes probióticos; tal efeito assenta no aumento da produção de macrófagos e anticorpos IgA, bem como em alterações substanciais na produção de citocinas (Marin *et al.*, 1997).

### Produtos lácteos enriquecidos com agentes probióticos

Em tecnologia alimentar, procura-se actualmente desenvolver novos produtos com elevada qualidade e possuindo grande valor acrescentado, i.e. alimentos funcionais (ou nutraceuticos). No âmbito deste desiderato, o aumento do valor nutritivo e terapêutico trazido pelas bifidobactérias tornou-as alvo preferencial de uma série de programas de investigação aplicada; gerou-se, então, um interesse considerável no sentido da incorporação das bifidobactérias em determinados alimentos, tendo sido muitos os produtos introduzidos no mercado como veículos para tais agentes probióticos. Os veículos existentes hoje em dia integram três grandes grupos: alimentos infantis, leites fermentados e outros produtos lácteos, e preparações farmacêuticas (Rasic e Kurmann, 1983). Destes, o grupo que regista maior desenvolvimento é o dos lacticínios; estimativas apontam para a existência de cerca de 80 produtos comerciais disponíveis no mercado mundial, os quais são produzidos essencialmente no Japão (que lidera o mercado com ca. 50 produtos), na Comunidade Europeia (incluindo Portugal, que começa lentamente a aderir a este novo segmento do mercado) e nos EUA (ver Tabela 5).

**Tabela 5.** Produtos comerciais que contêm *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus*.

Produto	País de origem	Microrganismos
A-38	Dinamarca	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , lactococos mesofílicos
A-B Iogurte	França	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Biomild	vários países	Ibidem
Cultura	Dinamarca	Ibidem
Milky	Itália	Ibidem
Nu-Trish A/B Milk	EUA	Ibidem
Acidophilus buttermilk	EUA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , lactococos mesofílicos
B-Active	França	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
BA Fresco	RU	Ibidem
Kyr	Itália	Ibidem
Yoplus	Austrália	Ibidem
Bifighurt	Alemanha	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biogarde	Alemanha	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Ofilus	França	Ibidem
Philus	Noruega	Ibidem
Biogurt	Alemanha	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biokys	Republica Checa	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Iogurte Acidophilus	vários países	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Iogurte-ACO	Suíça	Ibidem
Leite Acidophilus	vários países	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Leite Bifidus	vários países	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Leite de fermento Acidophilus	ex-URSS	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mil-Mil	Japão	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>
Progurt		<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , lactococos mesofílicos
Yakult	Japão	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>

(Adaptado de: Kurmann, 1988; Hoier, 1992)

Os produtos mais comuns incluem leites fermentados, iogurtes, gelados e queijos, em que as bifidobactérias

são adicionadas como aditivos para além da cultura de arranque convencional. Um estudo

relativamente recente refere uma nova possibilidade, que consiste na utilização de estirpes probióticas

como cultura de arranque, o que abre, do ponto de vista tecnológico e bioquímico, perspectivas interessantes para o fabrico de queijos de leite de vaca (Gomes *et al.*, 1995) e de cabra (Gomes e Malcata, 1998b).

As espécies mais frequentemente utilizadas para a obtenção destes produtos são de origem humana, p.ex. *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (a mais comum e com maior êxito), *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* e *Enterococcus faecium* (Kurmann, 1988; Hoier 1992); considera-se que tais espécies reúnem as condições mais adequadas para fazer face às necessidades fisiológicas do hospedeiro pelo que, por isso, poderão mais facilmente colonizar o intestino. Outros estudos apontam para o uso de estirpes de origem animal: estas estirpes são mais fáceis de cultivar e mais resistentes às condições adversas prevalentes nos processos industriais, i.e. baixos valores de pH e presença de níveis não desprezáveis de oxigénio. Uma estirpe recentemente identificada, *B.*

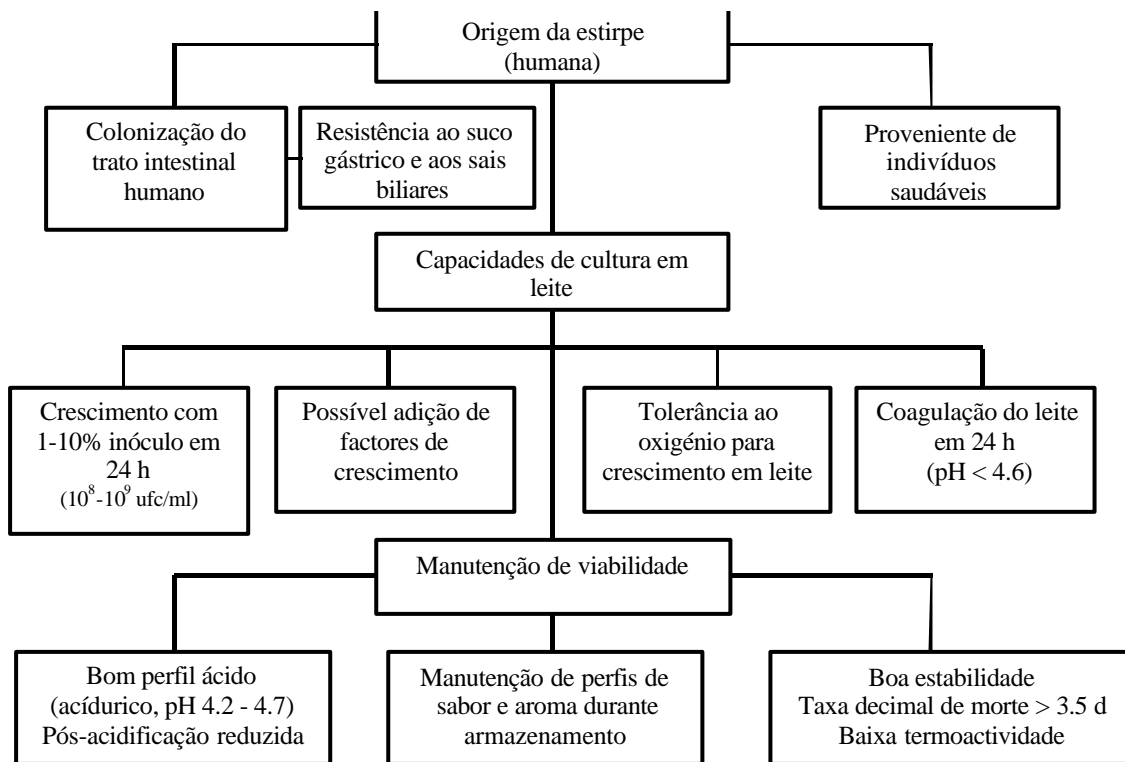
*lactis*, demonstra um bom potencial como aditivo alimentar: além do efeito benéfico desencadeado após a sua ingestão (Weerkamp *et al.*, 1993, 1996), tal espécie demonstra também uma boa tolerância a ácidos e ao oxigénio molecular (Gomes *et al.*, 1998a, b). As estirpes probióticas podem ser adicionadas 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 respectiva distribuição.

Além dos produtos alimentares descritos, existem no mercado preparações farmacêuticas contendo agentes probióticos. Em geral, estas consistem em cápsulas contendo populações bacterianas liofilizadas, sendo utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais, obstipação e algumas doenças hepáticas.

viáveis de *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* é um desafio que se coloca à indústria alimentar, pois trata-se de microorganismos que se multiplicam muito lentamente naquele meio líquido; tal implica fermentações longas e invariavelmente exigência de anaerobiose (como consequência das necessidades de potencial redox baixo na fase inicial de crescimento e da adição de factores de crescimento). Adicionalmente, as bifidobactérias produzem ácidos acético e láctico (nas proporções molares 3:2) durante a fermentação, o que pode criar importantes restrições organolépticas: um produto com sabor e aroma 'a vinagre' terá obviamente uma aceitação limitada por parte dos consumidores (Hoier, 1992). À luz destes factos, recomenda-se uma selecção cuidadosa das estirpes a utilizar e uma monitorização constante ao longo de todo o processo de manufactura por forma a assegurar um controlo mais eficaz dos produtos de fermentação, designadamente em termos do pH final. Muitas publicações referem como potencial alternativa, por um

**Aspectos tecnológicos**

A produção de leite fermentado de elevada qualidade contendo células



**Figura 4** Critérios de selecção de *Bifidobacterium* spp. para utilização como aditivos alimentares.

lado, o uso de culturas de *Bifidobacterium* spp. combinadas com culturas de *L. acidophilus* ou com culturas de outras bactérias lácticas, p.ex. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Hoier, 1992; Gomes *et al.*, 1995, 1998a; Samona *et al.*, 1996); algumas das vantagens oriundas desta solução incluem melhores taxas de crescimento, redução do tempo de fermentação, ausência de certos defeitos organolépticos e aumento do valor nutritivo dos produtos finais.

Existe um elevado número de publicações relativas às características desejáveis para um bom agente probiótico (Fuller, 1989; Hoier, 1992) e aos critérios que devem presidir à correspondente selecção (Kurmann e Rasic, 1991; Salminen *et al.*, 1996); estes estão condensados no fluxograma da Figura 4. Para além da necessidade de uma boa tolerância ao ácido e sais biliares (para assegurar a manutenção de um número elevado de células viáveis durante o armazenamento e passagem pelo tracto gastrointestinal), é igualmente conveniente que as estirpes seleccionadas sejam capazes de gerar um produto final com sabor e textura aceitáveis.

Devido à propagação lenta das bifidobactérias em leite, que se reflecte na falta de competitividade quando em presença de outros microorganismos, recomenda-se a produção das estirpes seleccionadas em larga escala; tal produção deve decorrer sob condições processuais pautadas por elevados padrões de higiene e parâmetros nutritivos óptimos. Diversos estudos apontam como conveniente a utilização de culturas liofilizadas ou ultracongeladas para inoculação directa, com capacidades de concentração até  $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc/g, de modo a permitir uma maior flexibilidade no controlo das qualidades organoléptica e microbiológica; tal é altamente desejável no fabrico de lacticínios à

escala comercial (Hoier, 1992; Blanchette *et al.*, 1995).

Além dos aspectos tecnológicos propriamente ditos, o controlo da viabilidade das estirpes no alimento que serve de veículo no momento de consumo é, igualmente, de elevada importância; para assegurarem um efeito benéfico, os produtos probióticos devem conter um mínimo de  $10^6$  ufc/mL, o que assenta no pressuposto de que a dose diária recomendada é de  $10^8$ - $10^9$  células viáveis, realizável pela ingestão de ca. 100 g de produto fermentado contendo  $10^6$ - $10^7$  células viáveis/mL (Rasic e Kurmann 1983). A viabilidade depende de múltiplos factores, p.ex. o pH (e o seu efeito tampão), a presença de microorganismos competitivos, a temperatura de armazenagem e a presença de inibidores bacterianos na matriz alimentar, como são o cloreto de sódio e o peróxido de hidrogénio (Kurmann e Rasic, 1991). Com efeito, dos vários estudos de sobrevivência realizados por diversos investigadores, existe um consenso alargado de que produtos com acidez elevada (p.ex. iogurte) conduzem a uma maior perda de viabilidade do que produtos com baixa acidez (p.ex. iogurte gelado, gelado tradicional e queijo), pelo que, e conforme atrás mencionado, é necessário efectuar uma selecção cuidadosa das estirpes a utilizar. Na tentativa de melhorar a viabilidade a longo prazo das estirpes probióticas, foram executados diversos estudos sobre novas metodologias, que englobam quer a substituição do vector alimentar (Dinakar e Mistry, 1994; Gomes *et al.*, 1995; Gomes e Malcata, 1998a) quer a protecção de estirpes sensíveis ao ácido por microencapsulação com acetatoftalato de celulose (Rao *et al.*, 1989) ou com alginato de cálcio (Kim *et al.*, 1996). O primeiro método apresenta-se como o melhor, em termos tecnológicos e em termos comerciais: p.ex. uma cultura de arranque composta unicamente pelas estirpes *L. acidophilus* e *B. lactis* foi utilizada com sucesso no fabrico de queijo, o qual era caracterizado por

sabor e aroma aceitáveis e possuía células viáveis de ambas as estirpes probióticas bem acima de  $10^6$  ufc/g<sub>queijo</sub> no momento de consumo (Gomes *et al.*, 1995; Gomes e Malcata, 1998b).

Finalmente, o progresso verificado no conhecimento de efeitos probióticos, assim como a identificação de estirpes resistentes a factores ambientais e novos veículos alimentares com maior capacidade para assegurar a sobrevivência e viabilidade, têm vindo a fortalecer a sua importância na dieta alimentar. Embora permaneçam ainda algumas perguntas por responder, pode afirmar-se existirem já as ferramentas necessárias para identificar potenciais soluções e testar as hipóteses iniciais de Tissier e Methnikoff.

## Bibliografia

- Babu, V., Mital, B. K. e Garg, S. K. 1992. Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 67-70.
- Blanchette, L., Roy, D. e Gauthier, S. F. 1995. Protective effect of ultrafiltered retentate powder on stability of freeze-dried cultures of bifidobacteria during storage. *Milchwissenschaft* **50**, 363-367.
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M. e Biavati, B. 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 199-210.
- Dinakar, P. e Mistry, V. V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **77**, 2854-2864.
- Finegold, S. M., Sutter, V. L. e Mathisen, G. E. 1983. Normal indigenous intestinal flora. Em Hentges, D. J. (ed.), *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, pp. 3-31, Academic Press, New York, EUA.
- Fuller, R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 365-378.
- Gibson, G. R. e Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of

- prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**, 1401-1412.
- Gomes, A. M. P. e Malcata, F. X. 1998a. Development of a probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* **81**, 1492.
- Gomes, A. M. P. e Malcata, F. X. 1998b. Use of small ruminants' milks supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 839.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. e Klaver, F. A. M. 1998. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *Journal of Dairy Science* **81**, 2817.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M. e Grande, H. J. 1995. Incorporation of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **49**, 71-95.
- Hassinen, J. B., Durbin, G. T., Tomarelli, R. M. e Bernhart, F. W. 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *Journal of Bacteriology* **62**, 771-777.
- Havenaar, R. e Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics; a general review. *Em Wood, B. (ed.), The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, pp. 151-170, Elsevier, Barking, RU.
- Hoier, E. 1992. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food in Australia* **44**, 418-420.
- Kim, K. I., Baek, Y. J. e Yoon, Y. H. 1996. Effects of rehydration media and immobilization in Ca-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Korean Journal of Dairy Science* **18**, 193-198.
- Klaver, F. A. M., Kingma, F. e Weerkamp, A. H. 1993. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **47**, 151-164.
- Kurmann, J. A. 1988. Starters for fermented milks: starters with selected intestinal bacteria. *Bulletin of the International Dairy Federation* **227**, 41-55.
- Kurmann, J. A. e Rasic, J. L. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. *Em Robinson, R. K. (ed.), Therapeutic properties of fermented milks*, pp. 117-157, Elsevier Applied Science Publishers, Londres, RU.
- Lilly, D. M. e Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747-748.
- Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z. e Pestka, J. J. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* **80**, 2713-2720.
- Marshall, V. M. e Cole, W. M. 1983. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *Journal of Dairy Research* **50**, 375-379.
- Marteau, P. e Rambaud, J. C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 207-220.
- Mital, B. K. e Garg, S. K. 1992. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. *Food Reviews International* **8**, 347-389.
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* **6**, 263-268.
- Modler, H. W. 1994. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal* **4**, 383-407.
- Morotomi, M. 1996. Properties of *Lactobacillus casei* Shirota strain as probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **5**, 29-30.
- Nahaisi, M. H. 1986. *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. Chapter 6. *Em Robinson, R. K. (ed.), Developments in Food Microbiology*, pp. 153-178. Elsevier Applied Science Publishers, Londres, RU.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* **29**, 4-8.
- Proulx, M., Ward, P., Gauthier, S. F. e Roy, D. 1994. Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate fractions. *Le Lait* **74**, 139-152.
- Rao, A. V., Shiwarnarain, N. e Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **22**, 345-349.
- Rasic, J. L. e Kurmann, J. A. 1983. Bifidobacteria and their role. Birkhäuser, Basileia, Suíça.
- Reuter, G. 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. *Bifidobacteria Microflora* **9**, 107-118.
- Roy, D., Dussault, F. e Ward, P. 1990. Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft* **45**, 500-502.
- Salminen, S., Isolauri, E. e Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 347-358.
- Samona, A., Robinson, R. K. e Marakis, S. 1996. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology* **13**, 275-280.
- Saxelin, M., Pessi, T. e Salminen, S. 1995. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 199-203.
- Sgorbati, B., Biavati, B. e Palenzona, D. 1995. The genus *Bifidobacterium*. *Em Wood, B. J. B. e Holzapfel, W. H. (eds), The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, capítulo 8, pp. 279-306, Blackie Academic, Londres, RU.
- Tahri, K., Grill, J. P. e Schneider, F. 1997. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Current Microbiology* **34**, 79-84.
- Ventling, B. L. e Mistry, V. V. 1993. Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* **76**, 962-971.
- Yaeshima, T. 1996. Benefits of bifidobacteria to human health. *Bulletin of the International Dairy Federation* **313**, 36-42.