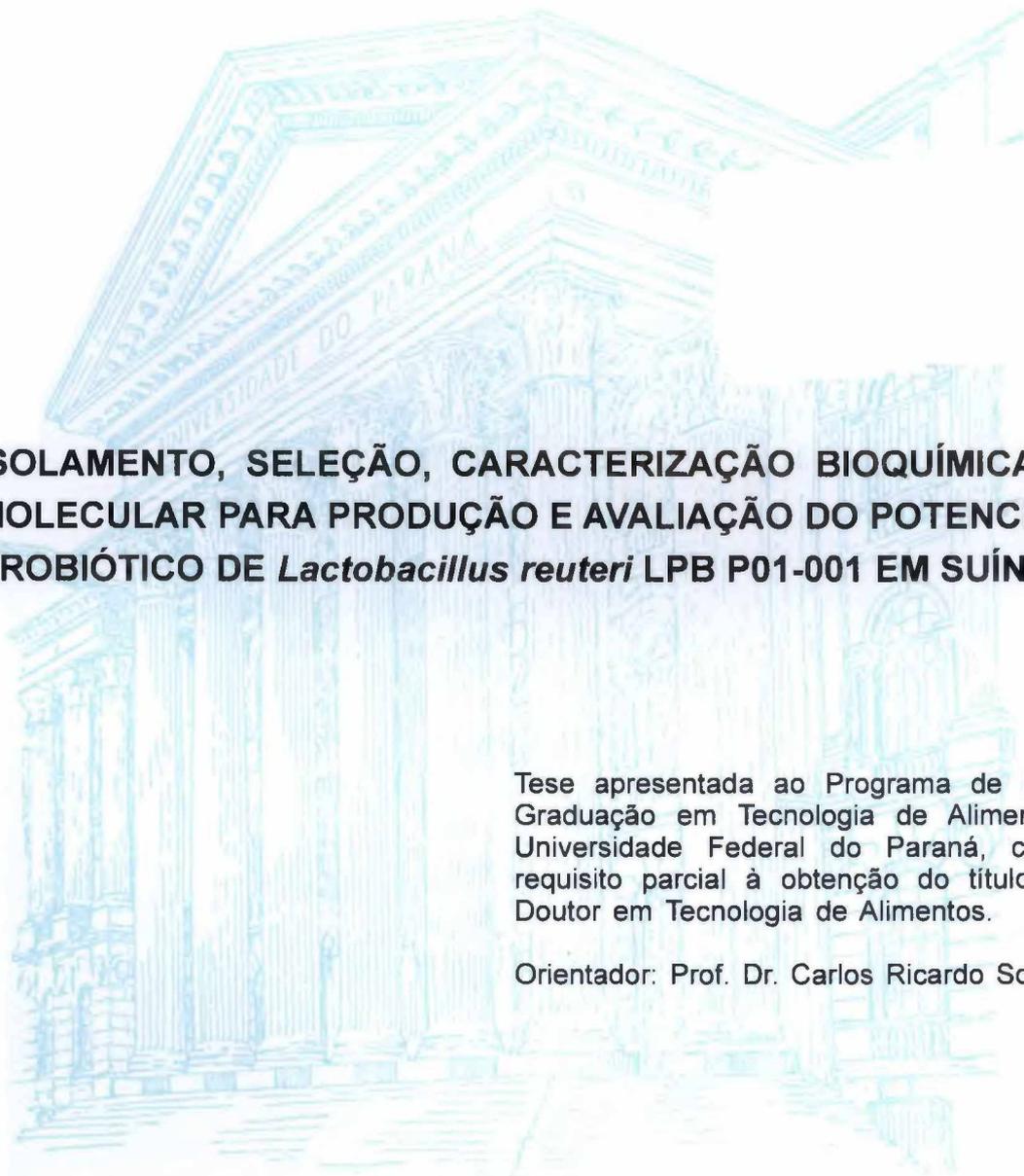


ELIZETE DE FÁTIMA REQUE PANCHENIAK



ISOLAMENTO, SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR PARA PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 EM SUÍNOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA
2005

ELIZETE DE FÁTIMA REQUE PANCHENIAK

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR PARA PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 EM SUÍNOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2005

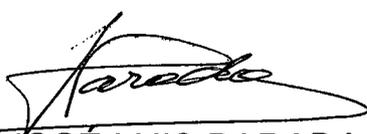
ELIZETE DE FÁTIMA REQUE PANCHENIAK

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR PARA PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 EM SUÍNOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:


Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. JOSÉ LUIS PARADA
Professor Visitante, UBA – PVE-Capes/TC/PPGTA


Dr. RAFAEL NEME
Grupo Ouro Fino


Prof. Dr. NELCINDO NASCIMENTO TERRA
Centro de Ciências Rurais, UFSM


Prof.^a Dr.^a ARISLETE DANTAS DE AQUINO
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 19 de Dezembro de 2005

*À minha família, dedico;
A Ivan, meu filho, ofereço.*

AGRADECIMENTOS

Expresso a minha gratidão às pessoas e instituições que contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

Ao Prof^o Dr^o Carlos Ricardo Soccol pela orientação, apoio e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, em especial aos Profs. Dr^o Renato João Sossela de Freitas e Dr^a Maria Lucia Masson, pela minha formação acadêmica.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos e apoio financeiro destinado a pesquisa.

Aos Profs. Dr^a Vanete Thomaz Soccol, Dr^o Osmir José Lavoranti, Dr^o José A. Rodriguez-Leon e Dr^o José Luiz Parada pelas sugestões e pela disposição em compartilhar informações e o seu conhecimento.

À equipe técnica da Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia, em especial a Mitiyo Myaoka que foi imprescindível durante a execução dos trabalhos práticos.

Às colegas Elza Maria Galvão Ciffoni, Cristina Ramírez, Herta Stutz Dalla Santa e Cristina Elisabete Knoerr pelas sugestões, troca de informações e apoio.

À Prof^a Dr^a Adriane Medeiros pelas correções, sugestões e apoio.

Às Bibliotecárias Eliane Maria Stroparo e Ângela Pereira Farias Mengatto pela revisão e correção das referências.

À OuroFino Saúde Animal pelo auxílio financeiro que permitiram a execução deste trabalho..

Aos Laboratórios Marcos Enrietti e Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) pelas doações de cepas patogênicas, possibilitando a realização experimental.

A CPQBA-UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) pela realização das análises moleculares.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	2
1.3 PERSPECTIVA	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 SUÍNO (<i>Sus scrofa</i> , Linnaeus, 1758).....	3
2.1.1 Classificação Científica	3
2.1.2 Manejo de Suínos.....	4
2.1.3 Microflora Gastrintestinal de Suíno e sua Contribuição para Resistência.....	6
2.2 PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA SUINOCULTURA.....	6
2.2.1 Conceitos de Utilização de Promotores de Crescimento.....	7
2.2.2 Características de um Promotor de Crescimento.....	7
2.3 ANTIBIÓTICO.....	8
2.4 PROBIÓTICO.....	11
2.4.1 Mecanismo de Ação dos Probióticos	13
2.4.1.1 Inibindo a proliferação de bactérias patogênicas	14
2.4.1.2 Produzindo enzimas digestivas e sintetizando vitaminas.....	14
2.4.1.3 Produzindo metabólitos capazes de neutralizar as toxinas	15
2.4.1.4 Competição por sítios de ligação	15

2.4.1.5	Competição por nutrientes.....	15
2.4.1.6	Ativação da imunidade humoral e celular.....	16
2.4.2	Seleção e Requisitos para um Microrganismo ser Probiótico	17
2.5	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	19
2.5.1	Características do Gênero <i>Lactobacillus</i>	23
2.5.1.1	Atividade antimicrobiana	26
2.5.2	Características Morfológicas e Citológicas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	29
2.5.2.1	Reuterina.....	31
2.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	34
2.6.1	Estrutura dos Ácidos Nucléicos	34
2.6.2	Extração e Análise de DNA	36
2.6.3	Detecção e Quantificação de DNA	37
2.6.4	Eletroforese	38
2.6.5	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	39
2.7	MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL	41
2.7.1	Características Desejáveis de Microrganismos	42
2.7.1.1	Princípios do crescimento microbiano	43
2.7.1.2	A curva de crescimento microbiano	44
2.7.1.3	Cinética de processos fermentativos.....	46
2.7.2	Características Desejáveis de Meios de Cultivo	46
2.7.2.1	Cana-de-açúcar, fonte de matéria prima para cultivo de células microbianas	49
2.7.2.1.1	Panorama da produção de cana-de-açúcar.....	49
2.7.2.1.2	Origem da cana-de-açúcar.....	50
2.7.2.1.3	Definição de açúcar	51
2.7.2.1.4	Composição química do fruto agrícola da cana	53
2.7.2.1.5	Processo de produção de açúcar mascavo (cru).....	56

2.7.2.1.6 Açúcar mascavo	58
2.8 PROCESSAMENTO DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS PARA USO COMO PROBIÓTICO.....	60
2.9 PROGRAMAS DE ALIMENTAÇÃO DE SUÍNOS COM O USO DE PROBIÓTICO	62
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1 MICRORGANISMOS.....	64
3.2 EQUIPAMENTOS	64
3.3 DETERMINAÇÃO DO pH.....	65
3.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES.....	65
3.4.1 Açúcares Redutores.....	65
3.4.2 Açúcares não Redutores (Sacarose).....	66
3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	66
3.6 ISOLAMENTO DE <i>Lactobacillus</i>	67
3.7 ESCOLHA DE ANIMAL E ÓRGÃOS PARA ISOLAMENTO.....	67
3.8 ISOLAMENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS PARA SUÍNO.....	68
3.9 MANUTENÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS	69
3.10 SELEÇÃO DE CEPAS PROBIÓTICAS.....	69
3.11 SOBREVIVÊNCIA DOS MICRORGANISMOS DURANTE A LIOFILIZAÇÃO E ESTOCAGEM.....	69
3.12 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	70
3.12.1 Peso Seco	70
3.12.2 Contagem de Células Viáveis.....	70
3.13 ESTUDOS DE COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS	70
3.13.1 Produção da Catalase.....	71
3.13.2. Produção de Gás a partir de Glicose	71

3.13.3 Tolerância a Extremos de Temperatura.....	72
3.13.4 Comportamento em Relação ao Oxigênio Livre	72
3.13.5 Tolerância a Diferentes pH.....	72
3.13.6 Tolerância a Substâncias Inibitórias	73
3.13.7 Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono.....	73
3.14 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA	73
3.14.1 Difusão em Poços	73
3.14.1.1 Cultivo da cepa isolada supostamente produtoras de substâncias antimicrobianas isolada	74
3.14.1.2 Escolha e cultivo da cepa indicadora	74
3.14.1.3 Concentração dos metabólitos presentes no meio de cultivo das cepas investigadas	74
3.14.1.4 Determinação da capacidade inibitória dos concentrados e antibiótico.....	75
3.14.2 Determinação da Capacidade Inibitória do Sobrenadante da Fermentação do Caldo MRS por <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 em Mueller-Hinton.....	75
3.14.3 Determinação da Capacidade Inibitória da Reuterina.....	76
3.15 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	76
3.15.1 Extração do DNA e Amplificação do rDNA 16S.....	77
3.15.2 Seqüenciamento do PCR amplificado rDNA 16S.....	77
3.15.3 Análise Filogenética	78
3.16 COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM MEIO MRS.....	78
3.16.1 Preparo do Inóculo para a Fermentação.....	78
3.16.2 Fermentação do Substrato.....	79
3.16.3 Avaliação do Fermentado.....	79
3.17 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO.....	79
3.17.1 Composição do Meio Alternativo.....	79
3.17.2 Preparo do Meio Alternativo.....	81

3.17.3	Preparo do Inóculo e Fermentação.....	81
3.17.4	Delineamento experimental e análise estatística da otimização do meio alternativo.....	81
3.18	ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO ALTERNATIVO.....	82
3.18.1	Preparo do Inóculo para a Fermentação.....	82
3.18.2	Fermentação do Substrato	82
3.18.3	Avaliação do Fermentado.....	83
3.18.4	Análises da Evolução da Biomassa em Função do Tempo de Fermentação.....	83
3.19	PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO FORMULAÇÕES EM MEIO BÁSICO BALANCEADO	84
3.20	ESTUDO DO CRESCIMENTO CELULAR DO MEIO ALTERNATIVO COM ADIÇÃO DE URÉIA E FÓSFORO.....	85
3.20.1	Adição de Uréia.....	85
3.20.2	Adição de Fósforo.....	85
3.21	AVALIAÇÃO DA CEPA <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB P01-001 COM POTENCIAL PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE LEITÕES DESMAMADOS NA FASE DE CRECHE	86
3.21.1	Local.....	86
3.21.2	Animais e Instalações.....	86
3.21.3	Variáveis Estudadas	87
3.21.4	Tratamentos	87
3.21.5	Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	87
3.21.6	Alimentação.....	88
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89

4.1 ISOLAMENTO DE CEPAS COM POTENCIAL PARA USO COMO PROBIÓTICOS PARA SUÍNOS.....	89
4.2 SELEÇÃO DE CEPAS PROBIÓTICAS.....	90
4.3 ESTUDOS DO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS.....	92
4.3.1 Prova da Catalase.....	92
4.3.2 Identificação de Ácidos Orgânicos e Presença de Gás Produzidos pela Fermentação da Glicose.....	92
4.3.3 Tolerância a Extremos de Temperatura.....	93
4.3.4 Comportamento em Relação ao Oxigênio Livre.....	94
4.3.5 Tolerância a Diferentes pH.....	95
4.3.6 Tolerância a Substâncias Inibitórias.....	97
4.3.7 Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono.....	98
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	100
4.4.1 Atividade Antimicrobiana em Poços.....	100
4.4.2 Determinação da Capacidade Inibitória do Sobrenadante da Fermentação do Caldo MRS por <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 em Meio Mueller-Hinton.....	101
4.4.3 Determinação da Capacidade Inibitória da Reuterina.....	103
4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	104
4.6 CARACTERÍSTICAS DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB P01-001.....	107
4.7 COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM MEIO MRS.....	108
4.7.1 Produção de Ácidos Orgânicos em Caldo MRS.....	111
4.8 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO.....	112
4.8.1 Delineamento Experimental e Análise Estatística da Otimização do Meio Alternativo.....	114

4.9 ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DAS CEPAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO.....	116
4.9.1 Formulação 1% de Extrato de Levedura e 4% de Açúcar Mascavo.....	116
4.9.2 Formulação 2% de Extrato de Levedura e 3% de Açúcar Mascavo.....	126
4.10 PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO FORMULAÇÕES EM MEIO BÁSICO BALANCEANDO.....	129
4.11 ESTUDO DO CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO ALTERNATIVO COM ADIÇÃO DE URÉIA E FÓSFORO.....	132
4.11.1 Adição de Uréia.....	132
4.11.2 Adição de Fósforo.....	135
4.12 ANÁLISE ECONÔMICA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CEPA P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO.....	136
4.13 AVALIAÇÃO DA CEPA PROBIÓTICA <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB P01-001 SOBRE O DESEMPENHO DE LEITÕES DESMAMADOS NA FASE DE CRECHE.....	137
5 CONCLUSÃO	140
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	142
REFERÊNCIAS.....	143
ANEXOS	154

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIRETRIZES PARA AVALIAR O PROBIÓTICO PARA USO EM ALIMENTOS	12
FIGURA 2 - MICRORGANISMOS COMPETINDO POR NUTRIENTES.....	16
FIGURA 3 - BACTÉRIAS NÃO PATOGÊNICAS ESTIMULAM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA....	17
FIGURA 4 - VIA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF.....	20
FIGURA 5 - VIA HETEROLÁCTICA OU FOSFOCETOLASE.....	21
FIGURA 6 - MECANISMOS DE GERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	26
FIGURA 7 - MECANISMO DE DECOMPOSIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR CATALASE.....	26
FIGURA 8 - A REUTERINA COMO METABÓLITO INTERMEDIÁRIO NA VIA DA DEGRADAÇÃO DO GLICEROL.....	33
FIGURA 9 - ESTRUTURA EM DUPLA HÉLICE DA MOLÉCULA DE DNA.....	35
FIGURA 10 - ESQUEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS BÁSICAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	37
FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA.....	40
FIGURA 12 - ESQUEMA GERAL DE UM PROCESSO FERMENTATIVO	42
FIGURA 13 - <i>Saccharum officinarum</i>	50
FIGURA 14- FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR DE CANA-DE-AÇÚCAR	57
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRATO GASTRINTESTINAL DE SUÍNO.....	68
FIGURA 16- FERMENTADOR COM CAPACIDADE DE 2 LITROS	83
FIGURA 17 - SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS ISOLADAS LIOFILIZADAS APÓS UM MÊS DE ESTOCAGEM EM TEMPERATURA AMBIENTE	90
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DE P01-001 EM CALDO MRS.....	92
FIGURA 19- CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DE P08-002 EM CALDO MRS.....	93
FIGURA 20 - COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM 24 HORAS DAS CEPAS P01-001 E P08-002 A TEMPERATURAS DE 15, 37 E 45° C.....	94
FIGURA 21 - COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM 24 HORAS DAS CEPAS P01-001 E P08-002 EM AGITAÇÃO E ESTÁTICO.....	95
FIGURA 22 - CINÉTICA DAS CEPAS P01-001 (A) E P08-002 (B) EM DIFERENTES pH DO MEIO MRS.....	96
FIGURA 23 - TESTE DE TOLERÂNCIA FRENTE A DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS: MRS (CONTROLE), BILE (B), FENOL (F) E NaCl DA CEPA P01-001.....	97
FIGURA 24 - TESTE DE TOLERÂNCIA FRENTE A DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS: MRS (CONTROLE), BILE (B), FENOL (F) E NaCl DA CEPA P08-002.....	98
FIGURA 25 - RESULTADOS OBTIDOS (TROCA DA COR PÚRPURA DE BROMOCRESOL A COR AMARELA) DA FERMENTAÇÃO DE 49 AÇÚCARES DA GALERIA API 50CH.....	99
FIGURA 26 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS METABÓLITOS PRESENTES EM MEIO DE CULTIVO DAS CEPAS ISOLADAS E EFEITO DE ANTIBIÓTICO FRENTE A <i>Escherichia coli</i> HEMOLÍTICA SUÍNA.....	100
FIGURA 27 - INIBIÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> hemolítica suína PELO SOBRENADANTE-MRS DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON.....	102
FIGURA 28 - INIBIÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> PELO SOBRENADANTE-MRS DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON.....	102
FIGURA 29 - INIBIÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> hemolítica suína PELO SOBRENADANTE-GLICEROL DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON.....	103

FIGURA 30 - INIBIÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> PELO SOBRENADANTE-GLICEROL DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON.....	104
FIGURA 31- SEQUÊNCIA PARCIAL DE rDNA 16S DA AMOSTRA LPB-P01-001	105
FIGURA 32 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMONSTRANDO A RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE A AMOSTRA LPB-P01-001 E LINHAGENS DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE rDNA 16S.....	106
FIGURA 33 - COLÔNIAS DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001, EM ÁGAR MRS, PELO MÉTODO <i>POUR PLATE</i>	107
FIGURA 34 - MORFOLOGIA DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB P01-001 EM MICROSCÓPIO ÓPTICO	108
FIGURA 35 – CINÉTICA DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM CALDO MRS: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	109
FIGURA 36 - CINÉTICA DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 EM CALDO MRS: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	110
FIGURA 37 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001EM MEIO MRS.....	111
FIGURA 38 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 EM MEIO MRS.....	111
FIGURA 39 – CRESCIMENTO MICROBIANO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO ALTERNATIVO.....	112
FIGURA 40 – CRESCIMENTO MICROBIANO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB-P08-002 NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO ALTERNATIVO.....	113
FIGURA 41 - EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCAVO NO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001	114
FIGURA 42- EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCAVO NO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002.....	115
FIGURA 43- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO	117
FIGURA 44 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO.....	117
FIGURA 45 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	118
FIGURA 46 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	119

FIGURA 47– PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO COM MANUTENÇÃO DE pH a 6,5.....	120
FIGURA 48– PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO <i>Lactobacillus sp.</i> LPB-P08-002 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO COM MANUTENÇÃO DE pH a 6,5.....	121
FIGURA 49 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO SEM MANUTENÇÃO DE pH.....	121
FIGURA 50 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB-P08-002 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO SEM MANUTENÇÃO DE pH.....	122
FIGURA 51 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO.....	123
FIGURA 52 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO.....	123
FIGURA 53 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO.....	124
FIGURA 54 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO.....	124
FIGURA 55 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	126
FIGURA 56 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO SEM MANUTENÇÃO DE pH.....	127
FIGURA 57 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO.....	128
FIGURA 58 - CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO BÁSICO BALANCEADO COM URÉIA E CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DE EXTRATO DE LEVEDURA.....	131
FIGURA 59 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCADO E 0,06% DE URÉIA, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH.....	132

FIGURA 60 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO COM ADIÇÃO DE URÉIA E SEM MANUTENÇÃO DE pH	133
FIGURA 61 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO: 2% EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCADO E 0,06% DE URÉIA.....	134
FIGURA 62 - CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO BÁSICO BALANCEADO COM URÉIA ACRESCIDO DE EXTRATO DE LEVEDURA E FONTE DE FÓSFORO: FOSFATO MONOBÁSICO DE POTÁSSIO(KH_2PO_4) E FOSFATO DIBÁSICO DE POTÁSSIO (K_2HPO_4).....	135

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – AGENTES CAUSADORES DA DIARRÉIA EM SUÍNOS NOS PAÍSES: CANADÁ, ESTADOS UNIDOS E AUSTRÁLIA.....	5
QUADRO 2 – CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE <i>Lactobacillus fermentum</i> E <i>L. reuteri</i>	30
QUADRO 3 - GRUPO DE ALIMENTO AÇÚCARES, ADOÇANTES E SIMILARES, OS MICRORGANISMOS E TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA.....	53
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COLMO DE CANA MADURA, NORMAL E SADIA (DADOS EM PORCENTAGENS).....	55
QUADRO 5 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O AÇÚCAR COMUM REFINADO E O AÇÚCAR MASCAVO EM RELAÇÃO À SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (VALOR POR 100 g).59	
QUADRO 6 – FORMULAÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCAVO.....	80
QUADRO 7 – ESTIMATIVA DO MEIO BÁSICO BALANCEADO.....	130
QUADRO 8 – ANÁLISE ECONÔMICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CEPA P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO.....	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES DE pKa DE ALGUNS ÁCIDOS ORGÂNICOS	28
TABELA 2 - AÇÃO INIBIDORA DO ÁCIDO FÓRMICO FRENTE A BACTÉRIAS.....	29
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR TÍPICA DE MICRORGANISMOS.....	49
TABELA 4. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	66
TABELA 5 - TEMPOS DE RETENÇÃO DE ALGUNS PADRÕES, MONITORADOS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA, NAS CONDIÇÕES ACIMA.....	67
TABELA 6 – TRATAMENTOS COM DIETA BASAL, DIETA BASAL COM ANTIBIÓTICO E DIETA BASAL COM PROBIÓTICO.....	87
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO ALIMENTAR E ANÁLISE CALCULADA DOS COMPONENTES DAS RAÇÕES PARA LEITÕES DESMAMADOS	88
TABELA 8 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 E <i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002.....	125
TABELA 9 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO COM 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO.....	128
TABELA 10 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE <i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 EM MEIO COM 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCADO E URÉIA.....	134
TABELA 11 – GANHO DE PESO DIÁRIO (GPD), CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO (CDR) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DOS SUÍNOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS E PERÍODOS AVALIADOS.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCS	Associação Paulista de Criadores de Suínos
CME	Center for Microbial Ecology
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization
LDH	Ácido láctico desidrogenase
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (oxidado)
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (reduzido)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RNA	Ácido ribonucléico
ufc	Unidade formadora de colônia

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um probiótico específico para suínos e avaliar o seu efeito quando suplementado às dietas de leitões desmamados na fase de creche. De um total de 33 espécies bacterianas isoladas de suíno, duas foram selecionadas de acordo com a morfologia, coloração de Gram, viabilidade durante o processamento e estocagem. Estas foram testadas quanto à resistência à bile e fenol, tolerância a pH baixo e produção de substâncias antimicrobianas. Através do melhor rendimento no consumo de substrato (Y_{x/s}) foi selecionada a cepa P01-001. O isolado bacteriano foi avaliado como suplemento alimentar para suínos. Foram utilizados 36 leitões desmamados aos 23 dias de idade e avaliados quanto ao ganho de peso diário, consumo diário de ração e conversão alimentar na Fase 1 (23 a 35 dias de idade), Fase 2 (35 a 54 dias de idade), Fase 3 (54 a 72 dias de idade) e no período total (23 a 72 dias de idade) em três diferentes tratamentos, ração basal, ração basal com antibiótico e ração basal com *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001. A cepa P01-001 foi identificada através da seqüência 16S rDNA como *Lactobacillus reuteri*. O *Lactobacillus reuteri* é heterofermentativo, microaerófilo e cresce a temperatura de 37 °C. É uma cepa com potencial probiótico, resistente a altas concentrações de bile e baixo pH, apresenta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* hemolítica suína e *Staphylococcus aureus*. A máxima produtividade de biomassa de *Lactobacillus reuteri*, obtida neste trabalho, foi de 0,416 g/L.h em meio de cultura com 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo, sob condições de fermentação, temperatura de 37 °C e 8 horas. Os resultados experimentais mostraram que, em comparação com a presença e efeitos do antibiótico, a implantação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 na alimentação, resultou em efeitos similares, manifestados por ganho de peso e conversão alimentar durante a fase de creche de suínos.

Palavras-chave: *Lactobacillus reuteri*, suíno e probiótico.

ABSTRACT

The aim of the present work was to develop a swine-specific probiotics and to evaluate its effects when added to swine feeds after weaning. Out of a total of 33 strains isolated from swine, two strains were selected according to morphology, Gram stain, viability during processing and storage. These were tested for bile and phenol resistance, low pH tolerance and production of antimicrobial substances. Because of its yield - based on substrate consumption (Y_x/s) - the P01-001 strain was selected. This bacterial isolate was evaluated as a possible feed supplement for swine. The present experiment used thirty six piglets weaned at 23 days and evaluated daily for weight gain, daily feed consumption and feed conversion in phase 1 (23 at 35 days of age), phase 2 (35 at 54 days of age), phase 3 (54 at 72 days of age) and total period (23 at 72 days of age) under three different treatments: normal diet, diet supplemented with antibiotic, and diet supplemented with *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001. The P01-001 strain was identified as *Lactobacillus reuteri* by the 16S rDNA sequence. *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 - a heterofermentative, microaerophilic strain, grown at 37 °C - is a strain with probiotic potential, that is, it is resistant to high concentration of bile and low pH, and presents antimicrobial activity against swine hemolytic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The maximal biomass production of *Lactobacillus reuteri* was 0.416 g/L.h in a culture medium with 2% of yeast extract and 3% of brown sugar, under fermentation conditions: 37 °C and 8 hours fermentation. The results showed that, when compared to the presence and effects of antibiotics, *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 implantation presented a similar effect, manifested by weight gain and feed conversion in the growth of swine.

Key-Words: *Lactobacillus reuteri*, swine, probiotics.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é uma das mais desenvolvidas do mundo e produz carne a um dos menores custos. Assim, o Brasil é um dos grandes competidores neste mercado mundial.

A produção de suínos no sul do Brasil pode ser considerada como a mais tecnificada da América do Sul, atingindo bons índices de produtividade, colocando nosso país entre os sete maiores produtores mundiais, com 2,68 milhões de toneladas desse produto em 2004 (ABIPECS, 2006). A produção da carne suína no Brasil é 82,39% destinada ao consumo interno e os 17,61% restantes são exportados (SILVEIRA, 2005).

Devido ao fato da criação de suínos estar se tornando mais industrializada, o risco de uma maior perda econômica relacionada à diminuição do desempenho e da saúde torna-se primordial, e esforços neste sentido têm sido feitos para descobrir diferentes maneiras de melhorar a produção. Os promotores de crescimento, como antibióticos, têm sido utilizados com muito sucesso na criação de suínos, facilitando a produção em larga escala, mesmo em condições subótimas (VISEK, 1978).

Entretanto, consumidores e autoridades têm exibido uma preocupação crescente com o risco à saúde oferecido pelo consumo de carne contendo resíduos de aditivos alimentares, bem como o perigo de disseminar fatores de resistência causados pelo uso indiscriminado de antibióticos. É neste contexto que os probióticos, suplementos alimentares à base de microrganismos vivos (FULLER, 1989), quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2005) afetam benéficamente o hospedeiro animal melhorando o equilíbrio da microflora intestinal.

Quando estes probióticos são incorporados aos alimentos como parte do processo de elaboração ou como aditivos, geram alimentos funcionais, isto é, alimentos obtidos por qualquer procedimento, com características particulares de algum de seus componentes, sejam ou não nutritivos, que afetam de maneira positiva ou promovam um efeito fisiológico ao organismo, além de seu valor nutritivo tradicional (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; GÓMEZ-TREVIÑO, 2001).

1.1 JUSTIFICATIVA

Introduzir o uso de probióticos na alimentação de suínos visando um melhor desempenho na produção e sanidade dos animais sem o uso dos tradicionais promotores de crescimento (antibióticos).

1.2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um probiótico para a alimentação de suínos, de acordo com as seguintes etapas:

- a) escolha dos microrganismos adequados a serem usados como probióticos na produção da carne suína em substituição aos promotores de crescimento a base de antibióticos;
- b) isolamento, seleção *in vitro*, caracterização bioquímica e fisiológica de cepas com características probióticas;
- c) identificação molecular da cepa com potencial probiótico;
- d) desenvolvimento e otimização de um meio de cultivo alternativo de baixo custo para a obtenção de biomassa probiótica a ser produzida em larga escala;
- e) avaliação *in vivo* da eficiência do probiótico desenvolvido em leitões desmamados.

1.3 PERSPECTIVA

O uso de probióticos permite a eliminação de resíduos de antibióticos nas carcaças, atendendo a exigências do mercado para a exportação, além de outros benefícios relevantes, como o controle de diarreia e a imunoestimulação, podendo potencializar os programas de vacinação dos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SUÍNO (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758)

Atualmente, a carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo. Em 2004 os produtores de suínos em todo o planeta, produziram 100,39 milhões de toneladas de carne, sendo a produção brasileira de 2,68 milhões de toneladas (ABIPECS, 2006). O consumo mundial de carne suína, tendo como base uma população de seis bilhões de habitantes, pode ser estimado em 14,7 kg/habitante.ano. Cerca de 70% da carne de suíno produzida no Brasil é consumida sob a forma de produtos industrializados, num contexto em que começa a aumentar o consumo da carne suína *in natura*. Por sua vez, o mercado consumidor está cada vez mais exigente, demandando um produto de melhor qualidade produzido sob rigorosos critérios (SILVEIRA, 2005).

2.1.1 Classificação Científica

Reino: animalia

Filo: chordata

Classe: mammalia

Ordem: artiodactyla

Sub-ordem: ungulados

Família: suidae

Gênero: sus

Espécie: scrofa (AGS, 2006).

2.1.2 Manejo de Suínos

Os suínos levam em média 160 dias para chegar ao abate, com peso médio de 100 kg, passando por três seções (maternidade, creche e crescimento-terminação) durante o tempo de sua vida. A etapa maternidade é considerada desde o nascimento até aproximadamente 7 kg (23 dias). A etapa de creche envolve o desenvolvimento do peso dos suínos até aproximadamente 25 kg aos 63 dias. A fase de crescimento-terminação representa o intervalo de 25 a 113 kg (LUDKE; LUDKE, 2005).

Na produção da carne suína, um dos maiores problemas é a alta mortalidade, ao redor de 20%, especialmente após o desmame. A saída da maternidade para a creche representa um choque para os leitões, pois deixam a companhia materna e, em substituição ao leite, passam a se alimentar exclusivamente de ração. Por essa razão, os cuidados dedicados aos leitões, principalmente nos primeiros dias de creche, são importantes para evitar perdas e queda no desempenho, em função de problemas alimentares, causados pela limitada capacidade de digestão, e ambientais que, via de regra, resultam na ocorrência de diarreias. Além disso, problemas imunológicos também afetam o desempenho pós-desmame, visto que a sua imunidade ainda não é completamente efetiva (APCS, 2005; FÁVERO, 2005).

O crescimento e a terminação são as fases menos preocupantes dos suínos, desde que, ao iniciarem as mesmas, apresentem um peso compatível com a idade e boas condições sanitárias. Assim sendo, pode-se dizer que o sucesso nessas fases depende de um bom desempenho na fase maternidade e creche (FÁVERO, 2005).

Aproximadamente 41% da causa da morte deve-se a diarreia, a qual contribui significativamente para o decréscimo do desempenho e da saúde de suínos (LARPENT; CASTELLANOS; LARPENT, 1994). O QUADRO 1 apresenta os agentes causadores da diarreia em suínos nos países: Canadá, Estados Unidos e Austrália (JONSSON; CONWAY, 1992).

QUADRO 1 - AGENTES CAUSADORES DA DIARRÉIA, EM SUÍNOS, NOS PAÍSES: CANADÁ, ESTADOS UNIDOS E AUSTRÁLIA

Agente	Porcentagem de suínos		
	Canadá	Estados Unidos	Austrália
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica, K 88(mais freqüente), K 99, 987 P e F 41;	22	31	82
<i>Cryptosporidium</i>	15	18	1
Vírus gastroenterites	52	16	0
Rotavírus	9	14	4

FONTE: JONSSON; CONWAY (1992)

Os suínos são particularmente susceptíveis à diarreia durante os três períodos, isto é, durante a primeira semana, de duas a três semanas de idade e no desmame (McALLISTER; HAROLD; SHORT, 1979).

As espécies hemolíticas de *Escherichia coli* são achadas com alta freqüência em suínos (McALLISTER; HAROLD; SHORT, 1979; KANDLER; WEISS, 1989). Hoblet et al (1986) observaram casos de diarreia em leitões desmamados envolvendo *Escherichia coli* hemolítica.

A *Escherichia coli* apresenta-se sob a forma de bastonete e reage negativamente a coloração de Gram (BIER, 1985). As cepas de *E. coli*, quando aderem às vilosidades intestinais, desenvolvem problemas diarreicos, produzindo enterotoxinas que estimulam o enterócito a bombear líquido no lúmen intestinal, e aumentando a motilidade intestinal. A *E. coli* enterotoxigênica é a causa mais importante de diarreia em animais neonatos (SALDARRIAGA; CALLE; CAMACHO, 2000).

Para o tratamento da colibacilose tem-se utilizado antibióticos com resultados muito variáveis, devido à habilidade da *E. coli* em desenvolver resistência aos antibióticos (SAYAH, et al, 2005). O desenvolvimento de resistência aos antibióticos implica em uma troca genética estável, hereditário de geração em geração. Vários mecanismos podem alterar a composição genética bacteriana. Uma causa freqüente é a mutação devido à transferência de material genético de uma bactéria a outra (transdução ou conjugação). As trocas mutacionais, que conferem resistência a uma droga, podem simultaneamente alterar os fatores de virulência e afetar a patogenicidade do microrganismo. A *E. coli* é portadora de plasmídeos R que regulam

a resistência a um ou mais medicamentos. A resistência de cepas aos antibióticos é um sério problema de saúde, pois a proporção de bactérias entéricas que transportam plasmídeos para resistência a drogas múltiplas tem aumentado lentamente durante os últimos 25 anos (SALDARRIAGA; CALLE; CAMACHO, 2000).

2.1.3 Microflora Gastrintestinal de Suíno e sua Contribuição para Resistência

O suíno é um animal monogástrico cujo trato gastrintestinal normalmente possui uma flora bacteriana que irá suprimir bactérias não desejáveis. É colonizado por uma microflora relativamente rica, dominado por bactérias ácido lácticas, principalmente por *Lactobacillus* e *Streptococcus sp.* (FULLER, 1992; ROJAS; ASCENCIO; CONWAY, 2002).

Qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota intestinal, como o uso indevido de antimicrobiano e estresse de qualquer natureza do hospedeiro, poderá permitir a instalação e a multiplicação de microrganismos patogênicos. Logo, fica evidente que o equilíbrio da microflora intestinal, reflete diretamente em um bom estado de saúde do hospedeiro (SILVA; ANDREATTI, 2000).

2.2 PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA SUINOCULTURA

A função básica do trato gastrintestinal é converter o alimento ingerido em nutrientes necessários para as diversas reações químicas e metabólicas envolvidas no crescimento, manutenção, produção e reprodução. No desempenho dessa função, o trato gastrintestinal é continuamente e intensamente exposto à ação de agentes exógenos, que são ingeridos com os alimentos, ou pela ação dos microrganismos componentes da microflora intestinal.

Para assegurar que os nutrientes sejam ingeridos, digeridos, protegidos da destruição, absorvidos e transportados às células do organismo, são incluídos na dieta de suínos certos aditivos, em sua maioria, não nutritivos.

Na legislação brasileira (BRASIL, 1998), aditivo intencional é definido como: “toda substância ou mistura de substâncias, dotadas ou não de valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento” (Decreto nº 986 de 21.10.1969). Alguns dos aditivos usados são promotores de crescimento, onde geralmente referem-se aos antimicrobianos, embora, sob um aspecto mais amplo, devam-se considerar outros produtos, como os probióticos, as enzimas -beta-glucanase, os acidificantes - como ácidos fórmico, acético, propiônico, fumárico, cítrico, láctico, tartárico e málico (APCS, 2005; ROTH, 2005) e os beta-adrenérgicos – catecolaminas (LANCINI, 1994).

2.2.1 Conceitos de Utilização de Promotores de Crescimento

A função de um promotor de crescimento moderno é maior do que simplesmente melhorar o desempenho animal. Devido às exigências de países desenvolvidos, como os do Mercado Comum Europeu e o Japão, de não permitirem a presença de níveis detectáveis de resíduos de antibióticos na carne e seus derivados, o uso de sub-doses de ação sistêmica e absorvíveis de antibióticos têm sido reduzidos consideravelmente (LANCINI, 1994).

2.2.2 Características de um Promotor de Crescimento

Condições para um bom promotor de crescimento moderno:

- Melhorar o desempenho, efetivo e econômico;
- Atuar em baixas dosagens, com espectro de ação reduzido, e não serem utilizados em terapêutica humana ou veterinária;
- Não apresentar resistência cruzada a outros antimicrobianos;
- Permitir a manutenção do equilíbrio da flora gastrintestinal normal;
- Não estar envolvido nos processos de transferência de resistência às drogas;

- Não ser absorvível no nível gastrintestinal;
- Ser atóxico, para animais e homens (ISHIBASHI, 2002);
- Não ser mutagênico ou carcinogênico;
- Ser biodegradável e não poluir o meio ambiente (LANCINI, 1994).

2.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são compostos químicos utilizados para destruir ou inibir o crescimento de organismos infecciosos, amplamente utilizados na produção animal. Inicialmente eles eram usados somente como medida terapêutica (tratar o animal doente), mas com o avanço do conhecimento e o desenvolvimento de novos compostos, eles passaram a ser utilizados também como medida preventiva e promotores do crescimento para estimular e acelerar o crescimento de animais saudáveis, por exemplo sulfato de neomicina e oxitetraciclina (LEMIEUX; SOUTHERN; BIDNER, 2003). Seu uso garantiu os altos índices de produtividade obtidos nas últimas décadas, também a redução da mortalidade e morbidade e a manutenção do bem-estar animal. A utilização de antibióticos é considerada indispensável nos sistemas atuais de produção (VISEK, 1978). Eles são amplamente utilizados em todas as fases de produção, ou ciclo de vida dos animais.

Apesar de ainda não ser clara a associação entre o uso de antibióticos nas unidades de produção animal, o desenvolvimento de resistência e a sua transferência à população humana, vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de derivados animais seja uma possível via de transmissão de bactérias resistentes. Essas evidências levaram as organizações internacionais ligadas à saúde humana e animal a recomendar prudência no uso desses compostos.

A resistência a esses compostos é de conhecimento da comunidade científica desde a década de 1950, de acordo com Padilha (2003), esta resistência tem sido controlada por meio do desenvolvimento de novas famílias de compostos e/ou modificando-se as moléculas. A resistência antimicrobiana é onerosa, pois quando se usa um antibiótico em um ser humano ou animal e esse não atua com a eficácia

esperada, é preciso implementar métodos de diagnóstico para identificar o composto ao qual o organismo infeccioso é susceptível. Isto ocasiona demora no retorno ao estado de saúde do ser humano. Em algumas ocasiões a pessoa acometida pode vir a falecer se o organismo for resistente a várias bases antimicrobianas. O mesmo é válido para a população animal apenas diferenciando os efeitos. No caso do animal, ele demora a se recuperar, perde peso e em geral a sua conversão alimentar não se normalizará devido as lesões que, possivelmente, os organismos infecciosos tenham ocasionado.

Na Europa, a Suécia e a Dinamarca foram os primeiros países a estabelecer programas de controle de uso de antibiótico na produção animal (WEGENER; BAGER; AARESTRUP, 1997). Em 1986, a Suécia proibiu o uso de baixas doses de antibióticos na alimentação animal, como promotores de crescimento, direcionando o seu uso apenas à terapia de animais enfermos, e passou a requerer prescrição veterinária (JONSSON; CONWAY, 1992). A Dinamarca implementou medidas relacionadas à comercialização de antibióticos que determinaram redução do uso na produção animal, e também um sistema de monitoramento da resistência antimicrobiana, incluindo fases durante o processo de produção. Nos programas utilizados na Dinamarca, as bases antibióticas de uso na clínica médica não são recomendadas para uso na população animal. Assim, a avoparcina, espiramicina, tilosina, virginamicina, tetraciclina e penicilina não são usadas nos sistemas de produção dinamarqueses.

Nos Estados Unidos, o “Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana” teve início em 1996, através do trabalho conjunto do Centro de Controle de Doenças, da Agência de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration* – FDA) e do Departamento de Agricultura. O programa monitora modificações de susceptibilidade antimicrobiana de patógenos entéricos zoonóticos em espécies humanas e animais (enfermos e saudáveis) e em carcaças de animais. Em janeiro de 1999, o FDA aprovou um regulamento que eliminará a maioria dos antibióticos usados como promotores de crescimento. Os antibióticos autorizados: flavofosfolipol, monensina de sódio, salinomicina de sódio e avilamicina.

No Canadá existem processos de redução de uso e monitoramento, em fase de implementação, nas várias cadeias de produção.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003 (ANEXO 1), proíbe o uso de princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos (antibióticos) em animais cuja carne se destina ao consumo humano (RIO DE JANEIRO, 2005).

A comissão europeia está sugerindo a proibição definitiva do uso de antibióticos como promotores em alimentos. Os antibióticos cujo uso ainda é permitido como aditivo das rações terão sua utilização proibida a partir de janeiro de 2006 (UNIÃO, 2003).

As evidências microbiológicas e clínicas acumuladas até o momento sugerem fortemente a existência de uma associação entre o uso de antibióticos, na produção animal, e o aumento da prevalência de bactérias resistentes, na população humana. Este fato indica que a utilização de antibióticos na produção animal possa trazer entraves ao comércio internacional.

Nos países em que as atividades visando o controle do uso de antibióticos estão avançadas, os programas de garantia de qualidade, implementados na produção primária de suínos, aves, bovinos de corte e leite, incluem o controle do uso desses compostos em todas as fases. Paralelamente, foram implementados processos educativos direcionados a veterinários e produtores. Os países exportadores de alimentos, em outras regiões, podem ser beneficiados, se considerarem essas tendências (PADILHA, 2003).

2.4 PROBIÓTICOS

Os probióticos, suplementos alimentares à base de microrganismos vivos (FULLER, 1989) que, quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2005), afetam benéficamente o hospedeiro animal por melhorar o equilíbrio da microflora intestinal. Quando estes probióticos são incorporados em alimentos como parte do processo de elaboração ou aditivos, geram alimentos funcionais, isto é, alimentos obtidos por qualquer procedimento, com características particulares de algum de seus componentes, sejam ou não nutritivos, que afetam de maneira positiva ou promovam um efeito fisiológico ao organismo, além de seu valor nutritivo tradicional (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; GÓMEZ-TREVIÑO, 2001).

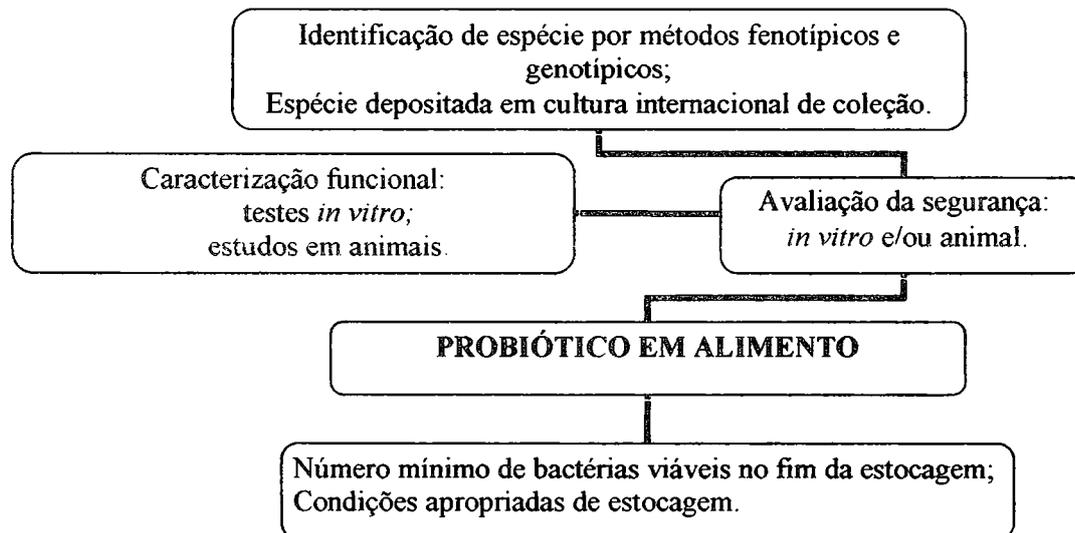
No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, regulamentou os alimentos funcionais e novos alimentos, através das seguintes resoluções ANVS/MS nº 16/99, ANVS/MS nº 17/99, ANVS/MS nº 18/99 e ANVS/MS nº 19/99. Tratam-se de regulamentos técnicos sobre procedimentos para registros de alimentos e/ou novos ingredientes e para alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem, diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança de alimentos e para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde, alegadas no rótulo dos alimentos. A resolução RDC nº 2 de 07/01/02 (ANEXO 1), da ANVISA, por sua vez, aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde (OLIVEIRA, 2005).

Os suplementos alimentares e preparações farmacêuticas estão promovendo a saúde baseados em várias características de certas espécies de bactérias ácidos lácticas, particularmente do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus* e também do gênero *Bifidobacterium*.

Vários critérios de seleção têm sido usados para novas espécies probióticas (FIGURA 1), os quais são: segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos. É necessário que as novas espécies probióticas sejam provenientes de um ser humano ou animal saudável, habitantes normais do intestino que não sejam patogênicas nem

toxigênicas e que sejam hospedeiro – específicas, a fim de que a máxima eficácia do produto seja atingida (SILVA; ANDREATTI, 2000). Aspectos funcionais incluem tolerância à acidez gástrica e toxicidade a bile, atividade hidrolase de sais de bile, atividade antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, habilidade de reduzir patógenos aderidos na superfície, habilidade de modulação da resposta imune e adesão no tecido intestinal. Aspectos tecnológicos incluem a habilidade de espécies probióticas de resistir a condições de produção industrial e sobreviver na formulação final do produto alimentício. Além disso, deve ser avaliado durante este processo: a habilidade de culturas em conservar sua função na área alvo, usualmente no trato gastrintestinal e co-existir com a microflora própria do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; ANNUK et al, 2003).

FIGURA 1 - DIRETRIZES PARA AVALIAR O PROBIÓTICO PARA USO EM ALIMENTOS



FONTE: FAO/WHO (2002)

O valor do probiótico varia conforme a origem, habitat e espécies de *Lactobacillus* (ANNUK et al, 2003).

As propriedades antagonistas podem ser úteis em produtos probióticos que são usados na alimentação animal. Muitos pesquisadores consideram que o principal interesse do uso do probiótico poderia ser sua eficiência na sanitização, melhoria na saúde e prevenção de infecções (CHATEAU; CASTELLANOS; DESCHAMPS, 1993).

Um dos primeiros artigos relatando o conceito do uso de microrganismos vivos e de substâncias para o melhoramento da saúde de suínos é de 1946, onde Mollgaard sugeriu o uso de bacilo produtor de ácido láctico, originado do próprio intestino do animal. O aumento dos níveis do ácido láctico no trato digestivo pode inibir a ação do ácido fítico, encontrado em sementes não germinadas que interfere na absorção de cálcio e fósforo, e com isso obter resultados na melhoria da saúde e formação esquelética de suínos (FULLER, 1992).

2.4.1 Mecanismo de Ação dos Probióticos

O mecanismo ou mecanismos de ação dos probióticos não estão inteiramente elucidados. Especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal. O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal parece ser fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro. A alta incidência e o constante estresse a que estão expostos os suínos em condições normais de criação, invariavelmente, podem alterar o equilíbrio intestinal e predispor os suínos a diversas infecções, além de reduzir os índices de produtividade (SILVA; ANDREATTI, 2000).

2.4.1.1 Inibindo a proliferação de bactérias patogênicas

Bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos, podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, substâncias semelhantes à bacteriocinas, ácidos orgânicos (agem pela redução do pH) e peróxido de hidrogênio, que teriam ação antibacteriana especialmente em relação às bactérias patogênicas (FULLER, 1992; PINTO; PONSANO; CASTRO-GOMEZ, 1996).

As bacteriocinas, definidas por Tagg, Dajani e Wanna Maker (1976), como substâncias de natureza protéica produzidas por bactérias que apresentam ação bactericida ou antagônica a outros tipos de bactérias, são freqüentemente relacionadas com a ação dos probióticos.

As bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro, prebióticos, produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, acético, butírico, láctico, bem como peróxido de hidrogênio, cujo espectro de ação inclui a inibição do crescimento de bactérias patogênicas Gram negativas. Os prebióticos beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no intestino. Os oligossacarídeos são as substâncias mais estudadas como prebióticos, pois há evidências de que os mananoligossacarídeos podem aderir às fimbrias bacterianas, bloqueando a adesão das bactérias à superfície intestinal (PELICANO; SOUZA; SOUZA, 2002).

2.4.1.2 Produzindo enzimas digestivas e sintetizando vitaminas

Os lactobacilos produzem a enzima beta galactosidase que facilita a digestão da lactose (TRAVIALIMENTOS, 2005).

2.4.1.3 Produzindo metabólitos capazes de neutralizar as toxinas

Produzindo metabólitos capazes de neutralizar as toxinas bacterianas *in loco* ou inibindo sua produção (*Bifidobacterium* sp. pode inibir a produção de amins produzidas pelas bactérias patogênicas).

2.4.1.4 Competição por sítios de ligação

O bloqueio dos sítios de ligação (receptores) na mucosa entérica pelas bactérias intestinais pode reduzir a área de interação nos cecos pelas bactérias patogênicas (competição por exclusão). Um número de interações entre bactérias não patogênicas e componentes do hospedeiro como a fibronectina e colágeno têm sido descritas. A ligação com fibronectina têm sido demonstrada com *Lactobacillus reuteri* e lactobacilos vaginais. Proteínas ligantes do colágeno provenientes de *L. reuteri* têm sido purificadas (ROOS et al, 1996; MUKAI et al, 2002).

Spencer e Chesson (1994) demonstraram que algumas espécies de *Lactobacillus*, particularmente espécies de *L. fermentum*, eram capazes de aderir fortemente às células epiteliais colunares de suínos.

O *Lactobacillus fermentum* produz biosurfactantes que são definidos como uma mistura de complexo biológico capaz de inibir a adesão de patógenos urogenitais (*Enterococcus faecalis*), identificado como proteína 29-KDa (p29) (HOWARD et al, 2000).

Segundo autores citados por Silva e Andreatti (2000), concluí-se que a ocupação física dos sítios intestinais pela microbiota normal, especialmente *Lactobacillus spp.*, poderia ser mais importante que outros fatores relacionados.

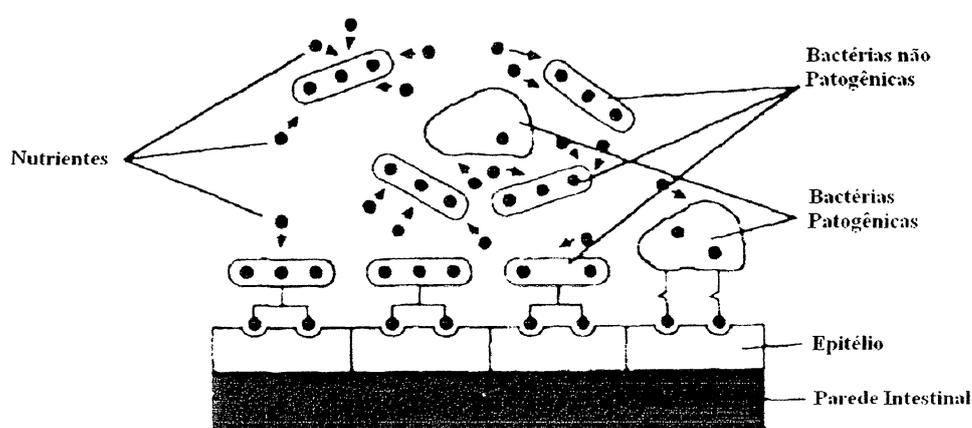
2.4.1.5 Competição por nutrientes

Embora possa parecer incoerente que exista supressão do crescimento de alguma espécie bacteriana intestinal, devido à carência nutricional, exatamente pelo

local em questão, tem sido demonstrado que este fato é verdadeiro, chegando a reduzir drasticamente algumas espécies da microbiota intestinal (SILVA; ANDREATTI, 2000).

Fox (1988) e Jin et al (1997) explicam que no intestino, os microrganismos do probiótico realizam uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por consequência, impedindo a proliferação destes (FIGURA 2).

FIGURA 2 –MICRORGANISMOS COMPETINDO POR NUTRIENTES



FONTE: FERREIRA; KUSSAKAWA (1999)

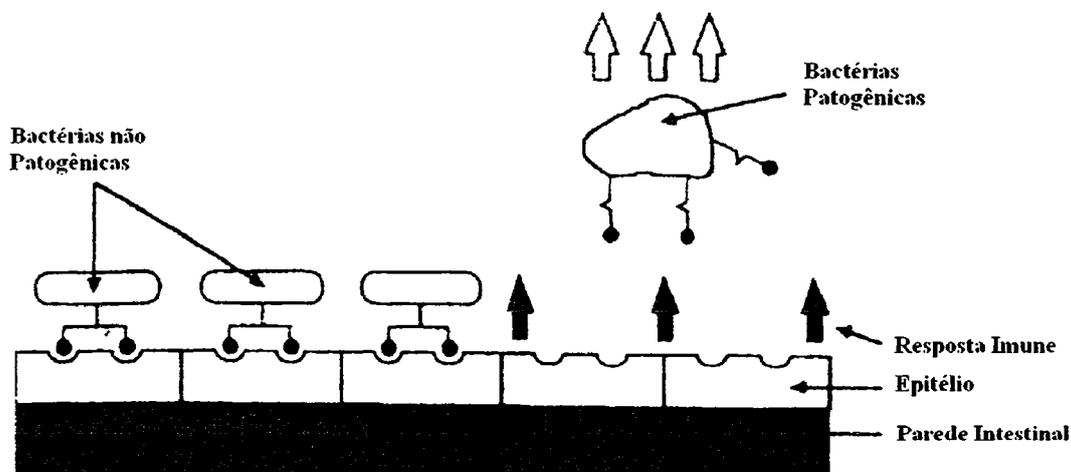
2.4.1.6 Ativação da imunidade humoral e celular

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como os *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune, por meio do aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T, produção de interferon, produção de imunoglobulinas (IgA) em resposta aos microrganismos enteropatogênicos, e podem acelerar a função fagocítica do sistema retículo-endotelial (FIGURA 3) (SILVA; ANDREATTI, 2000; TRAVIALIMENTOS, 2005).

Extrato da parede celular de *Lactobacillus fermentum* tem sido usado como imunostimulante e agente antitumoral. O ácido murâmico é um componente da parede celular de bactérias com qualidades imunostimulantes que pode ser

parcialmente responsável pelos efeitos antitumorais de extratos de bactérias Gram positivas (TURNER; GIFFARD, 1999; RIORDAN; MENG; TAYLOR, 2004).

FIGURA 3 – BACTÉRIAS NÃO PATOGENICAS ESTIMULAM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA



FONTE: FERREIRA; KUSSAKAWA (1999)

2.4.2 Seleção e Requisitos para um Microrganismo ser Probiótico

Na escolha de espécies microbianas um número de fatores deve ser considerado (FULLER, 1992):

- Biosegurança – A biosegurança é o primeiro passo na seleção de espécies microbianas para uso como probiótico. O probiótico deve conter microrganismos que são geralmente reconhecidos como seguros, como as espécies de *Lactobacillus* ou algumas espécies de *Bifidobacterium* e *Streptococcus*.
- Escolha da origem da espécie microbiana – O microrganismo poderá ser originário de uma coleção de cultura ou isolado. Esta escolha será determinada pelo propósito do probiótico e se a colonização é essencial para a aplicação do mesmo. A especificidade das espécies e localização representa uma importante função, neste caso, será de suma importância que a cepa tenha sido isolada da mesma localização onde a atividade da espécie será exibida no hospedeiro.

O probiótico poderá, preferencialmente, apresentar as seguintes características (FULLER, 1992):

- Capaz de ser produzido em larga escala e de maneira viável;

- Capaz de ser estocado e manter a sua viabilidade até o momento de uso;
- Ter condições de permanecer no ecossistema intestinal;
- Produzir um efeito benéfico no intestino animal;
- Ter habilidade de sobrevivência, não necessariamente de multiplicação, no intestino.

É importante que os microrganismos sejam:

- resistentes à ação dos ácidos gástricos durante sua passagem pelo trato digestivo superior (HENRIQUE et al, 1997). A primeira barreira do microrganismo no estômago é a acidez gástrica; a intensidade da ação inibidora depende do valor do pH e concentrações do ácido clorídrico. Alguns autores observaram que espécies de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram alta tolerância a pH 3 (XANTHOPOULOS; LITOUPOULOU-TZANETAKI; TZANETAKIS, 2000). O pH do HCl excretado no estômago é de 0,9, mas a presença de alimento faz com que o pH aumente o valor à 3,0. Após a ingestão do alimento, o estômago leva de 2 a 4 horas para esvaziar-se. As bactérias que sobreviveram nas condições ambientais do estômago irão mais adiante enfrentar o desafio do duodeno, secreções de bile e sais biliares (PENNACCHIA et al, 2004).
- tolerantes à bile, para que o microrganismo possa crescer no trato intestinal (GILLILAND; STAEY; BUSH, 1984). A média diária do fluxo biliar no suíno é muito alta, ao redor de dois litros para cada 40 kg de suíno (GILLILAND; WALKER, 1990; FULLER, 1992), em relação ao adulto humano (70 kg) que produz 400 a 800 mL de bile diária (SECRETION, 2005). Os sais biliares são liberados dentro do intestino delgado depois da ingestão de alimentos gordurosos. Apresentam uma função semelhante ao detergente e auxiliam na absorção e digestão de gorduras. Isto é crítico para os microrganismos, pois suas membranas celulares são compostas de lipídeos e ácidos graxos. Tem sido sugerido que a morte celular é devida a lise, entretanto, alguns microrganismos são capazes de diminuir o efeito detergente, por diminuição da solubilidade através da habilidade de hidrolisar os sais de bile pela enzima hidrolase de sais de bile. A resistência aos sais de bile varia muito entre as espécies de *Lactobacillus*. Considera-se que a concentração deva ser de 0,3% (p/v) de bile para ser

usada como seleção de espécies probióticas para humano (GILLILAND; STAEY; BUSH, 1984; PENNACCHIA et al, 2004).

Patel et al (2004) isolaram do intestino humano a espécie de *Lactobacillus reuteri* altamente resistente a 2% de bile.

Espécie de *L. fermentum* isolado de suíno foi tolerante a 0,3% de bile, inibindo o seu crescimento em torno de 50% (YU; TSEN,1993). Gilliland (1979) comprovou que lactobacilos isolados de intestino animal, como *L. fermentum* foram mais tolerantes a sais biliares que espécies isoladas de produtos lácteos.

- tolerância a fenol – Os fenóis podem ser formados no intestino por bactérias que desaminam alguns aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou produzidos por proteínas endógenas. Alguns autores sugerem que a concentração de 0,4% de fenol causa ação bacteriostática para alguns microrganismos. Espécies de *Lactobacillus acidophilus* mostraram alta tolerância (0,4-0,5%) para com o fenol (XANTHOPOULOS; LITOPOULOU-TZANETAKI; TZANETAKIS, 2000). Estes autores isolaram de fezes de crianças *Lactobacillus reuteri* DC423 com alta resistência (0,4%) a fenol. A contagem de células viáveis manteve-se completamente não afetado pelo fenol.

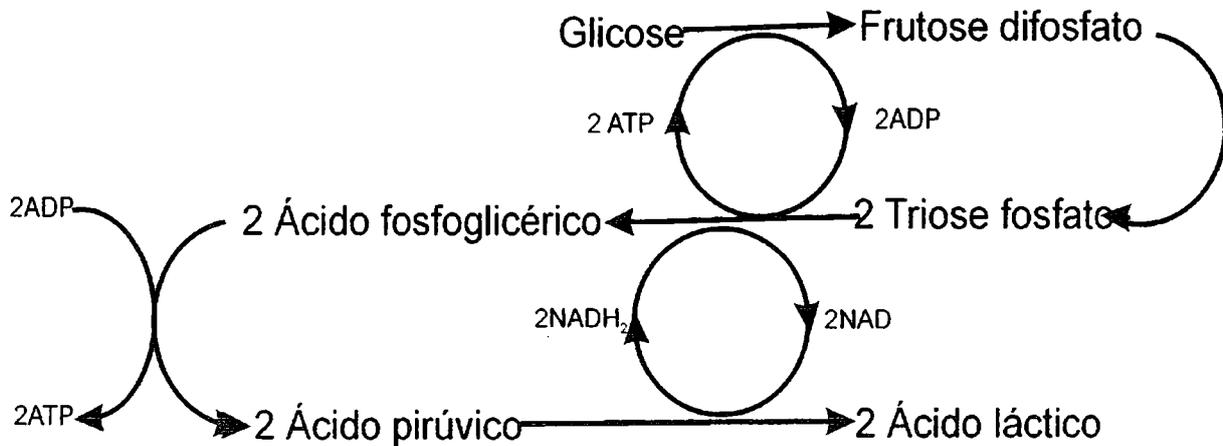
2.5 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

O grupo de bactérias ácido lácticas está definido vagamente e com limites imprecisos. Todos seus representantes compartilham a propriedade de produzir ácido láctico a partir de hexoses (JAY, 1994; MACEDO, 1997).

Com base nos produtos finais do metabolismo da glicose, as bactérias ácido lácticas são agrupadas em homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, porém são deficitárias de fosfoacetolase, utilizam a via glicolítica de Embden-Meyerhof (FIGURA 4) e produzem ácido láctico como maior produto da fermentação da glicose. Geralmente 85% ou mais e são capazes de fermentar a glicose mais diretamente a

ácido láctico que as heterofermentativas (um mol de hexose para dois moles de ácido láctico).

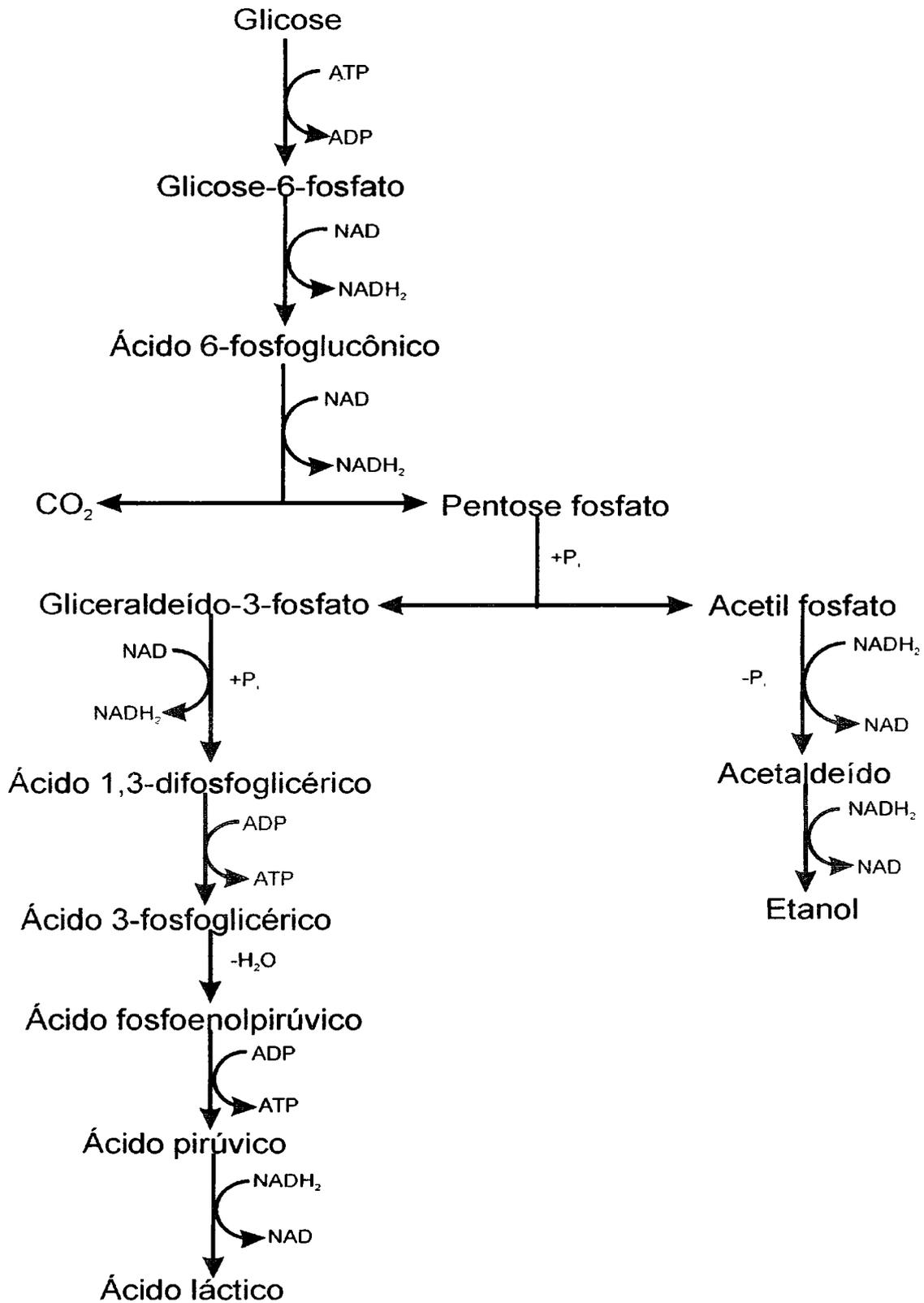
FIGURA 4 – VIA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF



FONTE: THE DIVERSITY (2005)

As heterofermentativas, por outro lado, possuem fosfoacetolase, porém não possuem aldolase e nem hexose isomerase e, em lugar de degradar a glicose pela via de Embden-Meyerhof, estes microrganismos utilizam a via alternativa da pentose ou hexose monofosfato (FIGURA 5), convertem açúcares de seis carbonos (hexoses) a cinco carbonos (pentoses) pela enzima fosfoacetolase, produzem um número de produtos além do ácido láctico, incluindo dióxido de carbono, ácido acético e etanol provenientes da fermentação de glicose (um mol de CO₂, um mol de etanol ou ácido acético e um mol de ácido láctico) (TARANTO; VALDEZ; PEREZ-MARTINEZ, 1999).

FIGURA 5 - VIA HETEROLÁCTICA OU FOSFOCETOLASE



As bactérias heterofermentativas são mais importantes que as homofermentativas sob o ponto de vista da produção de componentes de aroma e sabor, como diacetil (também com propriedade antimicrobiana), nos produtos lácteos fermentados (JAY, 1982). A produção de dióxido de carbono é indesejável nos embutidos crus curados por razões sensoriais e estéticas, entretanto do ponto de vista bacteriológico é positivo. Tem sido verificado efeito antibacteriano, do dióxido de carbono, em *Pseudomonas* (TAPIAS; LÓPEZ, 2005).

As homofermentativas incluem o gênero *Streptococcus* e *Pediococcus*. Os *Streptococcus* produzem L (+) lactato e os *Pediococcus* produzem DL lactato. As heterofermentativas consistem do gênero *Leuconostoc* e um subgrupo do gênero *Lactobacillus*, a Betabactéria. Os *Leuconostoc* produzem D (-) lactato; as Betabactérias produzem DL lactato.

As Betabactérias constituem em espécies de *Lactobacillus* que produzem dióxido de carbono proveniente da fermentação de glicose e frequentemente hidrolisam arginina.

As bactérias ácido lácticas são microrganismos fermentativos que são capazes de crescer em uma ampla faixa de pH na presença de ácidos orgânicos. O mecanismo de tolerância de acidez deste grupo de microrganismos não é completamente entendido, mas é aceito que ocorre a difusão passiva e que o acúmulo intracelular reduz o pH e afeta a permeabilidade da membrana. A produção de ácidos graxos presentes na membrana plasmática da bactéria determina a sua resistência aos estresses causados pela presença de ácidos. Portanto, ácidos orgânicos no meio podem contribuir para inibição do crescimento microbiano por aumentar o consumo de energia que mantém a homeostase de pH. Microrganismos fermentativos exibem uma melhor faixa de valores de pH interno que os aeróbios (McDONALD; FLEMING; HASSAN, 1990; GONZALO et al, 1998; CHERUBIN, 2003).

As bactérias ácido lácticas são conhecidas por produzirem uma abundante variedade de exopolissacarídeos. Os exopolissacarídeos podem contribuir para a saúde humana como prebiótico, ou pela sua atividade antitumoral, imunomodulador ou diminuição do colesterol (GEEL-SCHUTTEN, 1998).

2.5.1 Características do Gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* foram originalmente classificados por Orla e Jensen, 1919, em homofermentativos e heterofermentativos, baseado na quantidade produzida de ácido láctico durante a fermentação de glicose. Também dividiram os *Lactobacillus* em três grupos - Termobactéria, Streptobactéria e Betabactéria - baseados na temperatura de crescimento e reações bioquímicas. Embora a maior parte dos três grupos estão sendo renomeados, ainda é comum usar as três denominações e serem os *Lactobacillus* definidos de acordo com o crescimento em temperatura, habilidade em fermentar pentoses, habilidade em produzir dióxido de carbono provenientes da glicose ou gluconato, exigência para tiamina, produção de ácido láctico como principal produto de fermentação e tipos de fermentação: homofermentativos ou heterofermentativos, redução da frutose a manitol e hidrólise da arginina (HOLZAPFEL et al, 2001; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Os *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios fermentam hexoses, predominantemente ácido láctico, via Embden-Meyerhof, não fermentando pentoses. Eram classificados anteriormente, na grande maioria das vezes, como espécies de *L. acidophilus*. Recentemente, estas espécies foram reclassificadas em seis espécies diferentes e agrupadas por Johnson, 1980, em dois subgrupos, nomeados: Johnson subgrupo A, composto de *L. acidophilus* (*sensu stricto*), *L. crispatus*, *L. amylovorus* e *L. gallinarum*; e Johnson subgrupo B, composto de *L. gasseri* e *L. johnsonii* (MORELLI et al, 1998).

Os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos, nos quais as hexoses são fermentadas exclusivamente à ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof; as pentoses são fermentadas a ácido láctico e acético via indução da fosfoctolase (KANDLER; WEISS, 1989) eram classificados como *L. casei*, pois as espécies eram semelhantes fenotipicamente. Pela técnica da biologia molecular estas espécies têm sido classificadas em três espécies: *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (MORELLI et al, 1998).

Os *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios, nos quais as hexoses são fermentadas à ácido láctico, acético (etanol) e CO₂; as pentoses são fermentadas à ácido láctico e acético; em geral ambos os caminhos envolvem a fosfoacetolase (KANDLER; WEISS, 1989), foram todos originalmente atribuídos a espécies de *L. fermentum*, mas agora também compreende espécies de *L. reuteri* (MORELLI et al, 1998).

Os *Lactobacillus* apresentam-se sob a forma de bastonetes, variando de longo e fino para curtos cocobacilos; a formação de cadeia é comum, normalmente não apresentam mobilidade; são Gram positivos e catalase negativo. As colônias no meio ágar são usualmente pequenas (2-5 mm) lisas ou algumas vezes rugosas, convexas, de bordos regulares ou ligeiramente irregulares, freqüentemente translúcidas, não são pigmentadas, mas raras espécies produzem pigmento alaranjado ou avermelhado (KANDLER; WEISS, 1989).

A parede celular dos lactobacilos é composta por peptidoglicanas (mureína) e polissacarídeos fixados às peptidoglicanas por pontes de fosfodiéster (KANDLER; WEISS, 1989).

Normalmente o gênero *Lactobacillus* é caracterizado por microrganismos que necessitam de complexo nutricional de aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucléicos, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos, carboidratos fermentescíveis e vitaminas, com destaque para pantotenato de cálcio, niacina e tiamina. Os vários nutrientes essenciais necessários são normalmente encontrados quando o meio contém carboidratos fermentescíveis, peptona, extrato de carne e levedura. Suplementação com suco de tomate, manganês, acetato e ésteres de ácidos oléicos, especialmente Tween 80, são estimulantes ou até mesmo essenciais para muitas espécies. Geralmente os lactobacilos são cultivados em meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) e Betabacterium (KANDLER; WEISS, 1989; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Os *Lactobacillus* são acidúricos e o pH ótimo usualmente é 5,5 - 6,2; o crescimento geralmente ocorre a pH 5 ou menos; a velocidade de crescimento é freqüentemente reduzida em pH neutro ou em reações inicialmente alcalinas (KANDLER; WEISS, 1989).

Embora algumas espécies sejam aerotolerantes, o crescimento ótimo é alcançado sob condições microaerófilas ou anaeróbicas. Em condições microaerófilas, crescem melhor com baixa tensão de oxigênio (3-5%), as concentrações elevadas (21%) têm um efeito inibidor para estas bactérias (VARELA, 2005), provavelmente em razão da sensibilidade de suas enzimas às condições fortemente oxidativas (BIER, 1985). Em muitos casos, seu crescimento é estimulado na presença de até 5% de dióxido de carbono. Os lactobacilos crescem em temperatura de 2-53 °C, onde a temperatura ótima geralmente é entre 30-40 °C (KANDLER; WEISS, 1989; CHERUBIN, 2003). Obrigatoriamente sacarolíticos, atuando notadamente sobre hidratos de carbono.

Os lactobacilos são encontrados em laticínios, cereais, carne, peixe, água, esgoto, cerveja, vinho, frutas, sucos de frutas, picles de vegetais e silagem. Fazem parte da flora normal da boca, trato intestinal e vagina de muitos animais homotérmicos, inclusive o homem. A patogenezidade neste gênero é rara, algumas espécies são extensivamente usadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica devido às suas propriedades de melhoria da saúde (KANDLER; WEISS, 1989).

Os *Lactobacillus* têm mostrado possuir atividade inibitória na multiplicação de enteropatogênicos. Ainda não está elucidado como é o mecanismo antimicrobiano, se diferem de acordo com a bactéria alvo envolvida ou sua associação de virulência. A atividade inibitória tem sido encontrada contra microrganismos comensais ou patógenos, podendo ser de origem tanto Gram negativa como positiva.

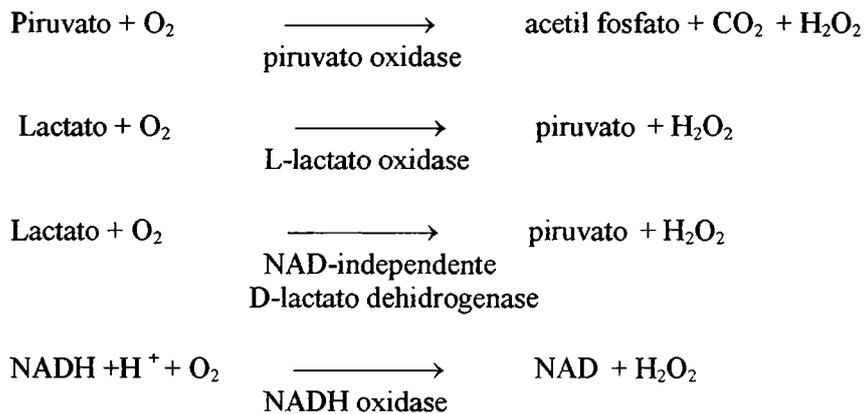
Os lactobacilos são altamente competitivos devido à produção de vários compostos antimicrobianos, como certos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, reuterina e bacteriocinas. Entretanto, diferentes compostos antimicrobianos têm mostrado propriedades antagônicas específicas contra patógenos Gram negativos e positivos, por exemplo: bacteriocinas, produzidas por bactérias ácidos lácticas, possuem atividade inibitória específica contra as Gram positiva e as Gram negativas são mais sensíveis a ácidos orgânicos, porém a aplicação no trato gastrointestinal não é clara, pois os testes inibitórios são predominantemente realizados *in vitro* (ANNUK et al, 2003).

2.5.1.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana deve-se à presença de compostos responsáveis por inibição de agentes patogênicos, entre os quais destacam-se:

a) peróxido de hidrogênio: o lactobacilo tem a habilidade de gerar peróxido de hidrogênio durante o crescimento por diferentes mecanismos: (FIGURA 6)

FIGURA 6 - MECANISMOS DE GERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO



FONTE: BEUCHAT; GOLDEN (1989)

O acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio de cultivo pode ocorrer, pelo fato de lactobacilos não possuírem a enzima catalase (a catalase é uma ferro-porfirina proteína que tem a propriedade de decompor H_2O_2 , FIGURA 7), poucas espécies decompõem o peróxido por uma pseudocatalase (KANDLER; WEISS, 1989).

FIGURA 7 - MECANISMO DE DECOMPOSIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR CATALASE



FONTE: BIER (1985)

A formação e acúmulo de peróxido de hidrogênio por lactobacilos em meio de cultivo com o subsequente efeito antagonista, foram mostrados com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp* (BEUCHAT; GOLDEN, 1989).

Kullisaar et al (2002) identificaram espécies de *Lactobacillus fermentum*, E-3 e E-18, com substancial atividade antioxidante, expresso pela enzima manganês superóxido dismutase que apresenta alta resistência a várias substâncias oxigênio reativas, como: peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxilas. Sua atividade antimicrobiana combinada com propriedades antioxidativas podem servir como principais defesas no ecossistema microbiano intestinal e sobretudo contra o estresse oxidativo endógeno e exógeno;

b) bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocinas: bacteriocinas são proteínas antibacterianas produzidas por bactéria que destroem ou inibem o crescimento de outras bactérias. O termo “substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas” (*Bacteriocin-like Inhibitory Substances – BLIS*) é aplicado às substâncias antagônicas que não são completamente ou não condizem aos critérios típicos de bacteriocinas. Elas têm sido reportadas por inibir uma larga faixa de ambas as bactérias: Gram positivo e Gram negativas (SAEED et al, 2004).

A reuterina, reutericina e reuter ciclina são compostos antagônicos de *Lactobacillus reuteri*. Recentemente, reuter ciclina, um ácido tetrâmico, foi purificado de culturas de *Lactobacillus reuteri* isoladas de cereais (GÄNZLE, 2004).

O *Lactobacillus fermentum*, espécie 466, produz uma única bacteriocina, a qual é uma proteína termoestável (resiste a temperatura de 96 °C por 30 minutos) e sensível a enzimas: tripsina e pepsina, mas não a lisozima (KLERK; SMIT, 1967; TAGG; DAJANI; WANNA MAKER, 1976). É uma proteína lipocarboidrato, composta de 16 aminoácidos, quatro açúcares, hexosamina e fósforo. A atividade biológica deste complexo é dependente da integridade estrutural (KLERK; SMIT, 1967);

c) ácidos orgânicos: os dados atuais sugerem que o modo de ação de ácidos orgânicos é atribuído à redução direta do pH do substrato, redução do pH celular interno por ionização dos ácidos não dissociados, ou interrupção do transporte do substrato pela alteração da permeabilidade da membrana celular.

A inibição do transporte de substrato ocorre pelo fato de que os ácidos orgânicos podem inibir a oxidação do NADH, eliminando suplemento de agentes redutores para os sistemas de transporte de elétrons (BEUCHAT; GOLDEN, 1989). A eficiência da inibição microbiana de um ácido depende de seu valor de pKa, que é o pH ao qual 50% do ácido está dissociado (TABELA 1). O pKa de muitos ácidos orgânicos está entre pH 3 e 5. Eles são geralmente mais efetivos em baixos valores de pH (BEUCHAT; GOLDEN, 1989).

TABELA 1 - VALORES DE pKa DE ALGUNS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Ácidos	pKa
Ácido fórmico	3,75
Ácido acético	4,75
Ácido propiônico	4,88
Ácido láctico	3,88
Ácido fumárico	3,03/4,38
Ácido cítrico	3,14/4,76/6,39
Ácido sórbico	4,76

FONTE: ROTH (2005)

Os ácidos orgânicos apresentam efeitos fisiológicos relacionados ao sistema imune, esvaziamento gástrico e motilidade intestinal e também com a absorção de minerais, especialmente cálcio, além da água.

O formiato é importante no metabolismo, na transferência de substâncias que contém um carbono e são geradas principalmente durante o metabolismo de aminoácidos. O ácido fórmico é um acidificante eficiente e, além disso, apresenta ação antimicrobiana independente de pH e inibe as descarboxilases e enzimas porfirínicas, especialmente a catalase.

O ácido fórmico é especialmente efetivo contra as leveduras e muitas bactérias (TABELA 2). As bactérias lácticas e os fungos são bastante resistentes ao ácido fórmico. O efeito antibacteriano pode ser explicado pela presença de prótons (íons H^+) e ânions ($HCOO^-$). O ácido fórmico divide-se depois de atravessar a parede celular das bactérias, inibindo a síntese de proteína bacteriana. Significa que as células bacterianas são submetidas a um considerável estresse, o qual impede sua multiplicação (LÜCK, 1981; APCS, 2005; ROTH, 2005).

TABELA 2 - AÇÃO INIBIDORA DO ÁCIDO FÓRMICO FRENTE A BACTÉRIAS

Bactéria	Valor de pH	Concentração inibidora limite em ppm
<i>Pseudomonas sp.</i>	6,0	250-750
<i>Micrococcus pyogenes</i>	6,0	1400
<i>Streptococcus lactis</i>	5,2	400
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	6,0	3500-5000
<i>Escherichia coli</i>	5,2	70-100
<i>Bacillus sp.</i>	6,0	50-500

FONTE: LÜCK (1981)

A ação antimicrobiana do ácido láctico é relativamente pequena. Atua principalmente contra as bactérias, especialmente as anaeróbias. Grande parte de sua atividade deve-se à diminuição do pH (LÜCK, 1981).

A ação antimicrobiana do ácido acético, como a do fórmico, deve-se à diminuição do pH pois atravessa a membrana celular e desnatura as proteínas do protoplasma. Num substrato acidificado à pH 3, a atividade antimicrobiana do ácido acético é de 10 a 100 vezes superior a de qualquer outro ácido, por exemplo, o ácido clorídrico. Esta diferença deve-se ao fato de que o ácido acético não dissociado penetra melhor na célula devido a sua lipossolubilidade (LÜCK, 1981).

2.5.2 Características Morfológicas e Citológicas de *Lactobacillus reuteri*

Outros nomes para *Lactobacillus reuteri* (NCBI, 2005a):

Lactobacillus fermentum biotipo II;

Lactobacillus fermentum subsp. *reuteri*;

Lactobacillus reuteri Kandler *et al.* 1982;

Lactobacillus reuteri (plasmid pGT232).

Origem do nome: *reuteri* de Reuter, nome de G. Reuter, um bacteriologista alemão.

Os *Lactobacillus reuteri* são ligeiramente irregulares, bastões inclinados com terminações arredondadas, geralmente 0,7-1,0 por 2,0-5,0 µm, apresentam-se sozinhos,

em pares e pequenos grupos. Geralmente crescem bem a 45 °C; é 40-42,3 % mol G+C (guanina+citosina) no ácido desoxirribonucéico (DNA), sendo o tipo de espécie DSM 20016. (KANDLER; WEISS,1989; DSMZ, 2005).

O *Lactobacillus reuteri* é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa obrigatória, habitante comum no trato gastrintestinal de seres humanos e animais. Pertence à microflora predominante de cereais fermentados e produtos provenientes da carne (KANDLER; WEISS,1989; GÄNZLE, 2004). Espécies de *Lactobacillus reuteri* foram isoladas do intestino de suíno (EL-ZINEY et al, 1998; JONSSON; STRÖM; ROOS, 2001), de peru, frangos, macacos (JONSSON; STRÖM; ROOS, 2001) e crianças (KAWAI et al, 2001).

A espécie *Lactobacillus reuteri* não pode ser distinguida da espécie *L. fermentum* por simples testes fisiológicos. A determinação da % mol G+C (guanina+citosina), ácido diamino da peptidoglicana ou mobilidade eletroforética de ácido láctico desidrogenase (LDH), claramente separa as duas espécies, QUADRO 2, (KANDLER; WEISS,1989).

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Lactobacillus fermentum* E *L. reuteri*

Espécie	Tipo de peptidoglicano	Mobilidade eletroforética d-LDH l-LDH		%Mol G+C	Isômero do ácido láctico	Crescimento a 15 °C	NH ₃ proveniente da arginina
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Ornitina-dAsp	1,85	-	52-54	DL	-	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lisina-dAsp	1,74	0,88	40-42	DL	-	+

FONTE: KANDLER; WEISS (1989)

NOTA: +, 90% ou mais de espécies positivas; -, 90% ou mais de espécies negativas.

Espécies de *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 produzem a enzima invertase, uma enzima hidrolítica que catalisa as ligações glicosídicas entre glicose e frutose da sacarose, usado para produção de açúcar invertido. A invertase (β -frutofuranosidase) de *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 é uma glicoproteína composta por uma única subunidade com um peso molecular de 58 kDa. A enzima é estável a temperatura

abaixo de 45 °C e na faixa de pH de 4,5 a 7, com máxima atividade a pH 6 a 37 °C (GINÉS; MALDONADO; VALDEZ, 2000). Uma razão na qual as enzimas mostram um pH ótimo é devido ao efeito do pH na estabilidade da molécula. O pH não favorável do meio afeta a ionização de aminoácidos residuais, que pode resultar em graves transições estruturais conformacionais devido à destruição da estabilidade estrutural iônica e ligações de hidrogênio (KAPLAN; BAKIR, 1998).

A espécie de *L. reuteri* 121 produz uma grande quantidade de exopolissacarídeos (homopolímeros da sacarose) glucana e frutana. As bactérias ácido lácticas exopolissacarídeas podem contribuir para a saúde humana como prebióticas por possuírem atividade antitumoral, imunomoduladora e redutora do colesterol (HIJUM et al, 2001).

O *Lactobacillus reuteri* é também considerado um candidato a probiótico, pois algumas espécies de *L. reuteri* apresentam vários efeitos benéficos ao organismo do hospedeiro, incluindo a proteção contra efeitos de patógenos como *Salmonella*, *Cryptosporidium* e rotavírus (MUKAI, 2002).

O *Lactobacillus reuteri* é utilizado como probiótico em leites fermentados, queijos e também se apresenta em comprimidos. Existem diversos trabalhos sobre os efeitos benéficos deste microrganismo, sua capacidade de implantação em humanos e seu emprego como suplemento alimentar (OROBÓN, 2003).

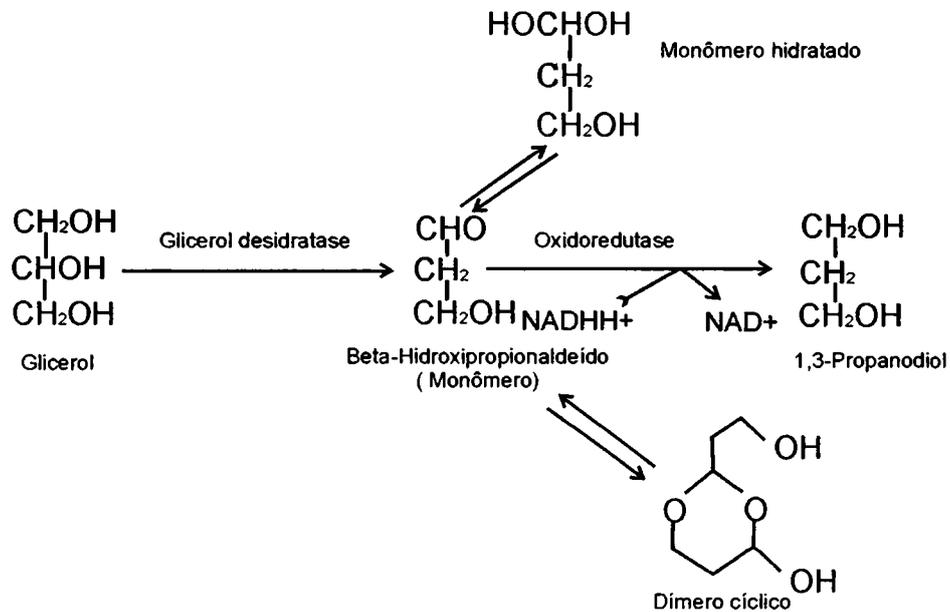
2.5.2.1 Reuterina

A reuterina - β -hidroxipropionaldeído - é uma potente substância antimicrobiana contra bactérias Gram negativas e positivas, leveduras, fungos e protozoários. A reuterina é uma substância neutra, solúvel em água, não protéica e de baixo peso molecular. Trata-se de um metabólito intermediário produzido durante a fermentação anaeróbica do glicerol por espécies de *Lactobacillus reuteri* (LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990; EL-ZINEY et al, 1998; GÄNZLE, 2004). Está descrita como um equilíbrio entre as formas monômero, monômero hidratado e dímero cíclico do β -hidroxipropionaldeído (β -HPA). É efetiva em um amplo intervalo de pH (de 2 a 8),

mostrando mais estável a pH ácido, enquanto que a pH 11 degrada-se imediata e irreversivelmente.

O β -HPA é um metabólito intermediário na via de redução do glicerol descrito em *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus*. Esta via permite a alguns lactobacilos, como *Lactobacillus reuteri*, utilizar o glicerol como aceptor de elétrons na presença de carboidratos assimiláveis, porém não como fonte de carbono (FIGURA 8). O glicerol transforma-se em β -HPA devido à glicerol desidratase coenzima B₁₂-dependente e, atua como aceptor externo de elétrons mediante sua redução a 1,3 propanodiol pela 1,3 propanodiol desidrogenase (oxidoreductase NAD⁺ dependente). A enzima glicerol desidratase de *Lactobacillus reuteri* tem sido purificada e caracterizada. Esta via está controlada geneticamente pela *dha* (dehidroxiacetona) regulação em *Klebsiella* ou *Citrobacter* e inclui um desvio oxidativo que leva o glicerol até o ciclo glicolítico. Quando o fornecimento de NADH procedente da glicólise termina, ou seja, na fase estacionária de crescimento, o *Lactobacillus reuteri* se diferencia de outros microrganismos por continuar produzindo β -HPA, apesar de não ser mais necessário do ponto de vista bioenergético. Este β -HPA é acumulado e excretado em condições de anaerobiose.

FIGURA 8 - A REUTERINA COMO METABÓLITO INTERMEDIÁRIO NA VIA DA DEGRADAÇÃO DO GLICEROL



FONTE: OROBÓN (2003)

A reuterina parece atuar sobre a síntese de DNA inibindo enzimas sulfidrilas implicadas na atividade ribonucleotídeo-redutase, sendo capaz de inibir patógenos Gram positivos como *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* ou *Bacillus* e Gram negativos como *E. coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Pseudomonas* ou *Salmonella*. As bactérias lácticas mostram-se mais resistentes a ação da reuterina, sendo necessárias concentrações 3 a 5 vezes maiores. A temperatura entre 10-30° C aumenta o efeito da reuterina, enquanto que o pH 4,5-6,5 e concentrações de sal (0,5-3%) não mostram interação com o efeito da reuterina em caldo Infusão Cérebro-Coração (Brain Heart Infusion - BHI) suplementado com glicose e extrato de levedura.

A hidrólise dos triglicerídeos da dieta pode contribuir para o glicerol necessário ao *Lactobacillus reuteri* para a produção de reuterina no intestino (OROBÓN, 2003).

2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS

Recentemente, muitos esforços têm sido feitos na procura de espécies de *Lactobacillus* isolados de seres humanos e animais com potencial probiótico. Para este propósito, métodos de identificação simples e seguros são requeridos. Testes convencionais bioquímicos e fisiológicos (DAVIS, 1955) certamente têm algumas limitações na discriminação de um grande número de isolados, mostrando semelhanças nas características fisiológicas. Entretanto, muitos estudos têm focalizados à aplicação de técnicas de biologia molecular para uma rápida identificação de *Lactobacillus*. A técnica de hibridização de DNA-DNA tem melhorado o conhecimento nas relações taxonômicas entre espécies de *Lactobacillus*, porém é uma técnica demorada e trabalhosa. Ao lado, vários métodos como: seqüenciamento de ácido desoxirribonucléico (DNA), análises de ácidos graxos e perfil do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática (RFLP) têm sido estabelecidos e aplicados para a identificação de probióticos. Recentemente, genes de RNA ribossomal têm sido geralmente aceitos como potenciais alvos para análises de identificação e filogenética de bactéria. Usando a reação da polimerase em cadeia (PCR) DNA ribossomal 16S ou DNA ribossomal 23S, *primers* alvos têm tido êxito na detecção e identificação em espécies correspondentes a *Lactobacillus* (SONG et al, 2000; KWON et al, 2004).

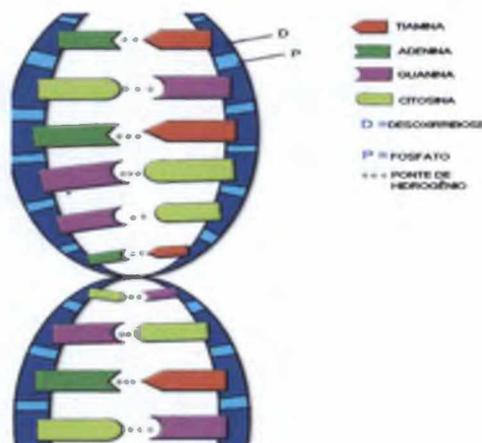
O método de referência é a hibridização DNA-DNA, porém pode ser usado o gene para o RNA ribossomal 16S (DNA ribossomal 16S), neste caso, é recomendável que a técnica genotípica seja correspondente aos testes fenotípicos para confirmação (FAO/WHO, 2002).

2.6.1 Estrutura dos Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são polímeros lineares de nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiésteres. Estes constituem os genes, localizados nos cromossomos das células. Os genes contêm as informações biológicas dos organismos que são realizadas por

meio do código genético, cuja tradução resulta na síntese protéica. Cada nucleotídeo é composto de um grupo fosfato, um açúcar (pentose) e uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica). Existem dois tipos de ácidos nucleicos, o ácido desoxirribonucléico (DNA) (FIGURA 9) e o ácido ribonucléico (RNA), cujas diferenças residem no tipo de açúcar e na composição de bases nitrogenadas da molécula. No RNA, a pentose é sempre a ribose, e, no DNA, é a desoxirribose. As bases adenina (A), guanina (G) e citosina (C) são encontradas tanto no DNA como no RNA. A base timina (T), só no DNA e, uracil (U), só no RNA (ANDREOTTI, 2000).

FIGURA 9 - ESTRUTURA EM DUPLA HÉLICE DA MOLÉCULA DE DNA



FONTE: BIOLOGYCORNER (2005)

Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por ligações fosfodiésteres formando entre si pontes de fosfato. O grupo hidroxila do carbono-3 da pentose do primeiro nucleotídeo se liga ao grupo fosfato ligado à hidroxila do carbono-5 da pentose do segundo nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster.

Devido a esta formação, a cadeia de DNA ou RNA fica com uma direção determinada, isto é, em uma extremidade tem-se livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e, na outra livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. Isto determina que a orientação química de uma fita de DNA ou RNA se faça na direção de 5' para 3'. (VIRTUAL, 2005).

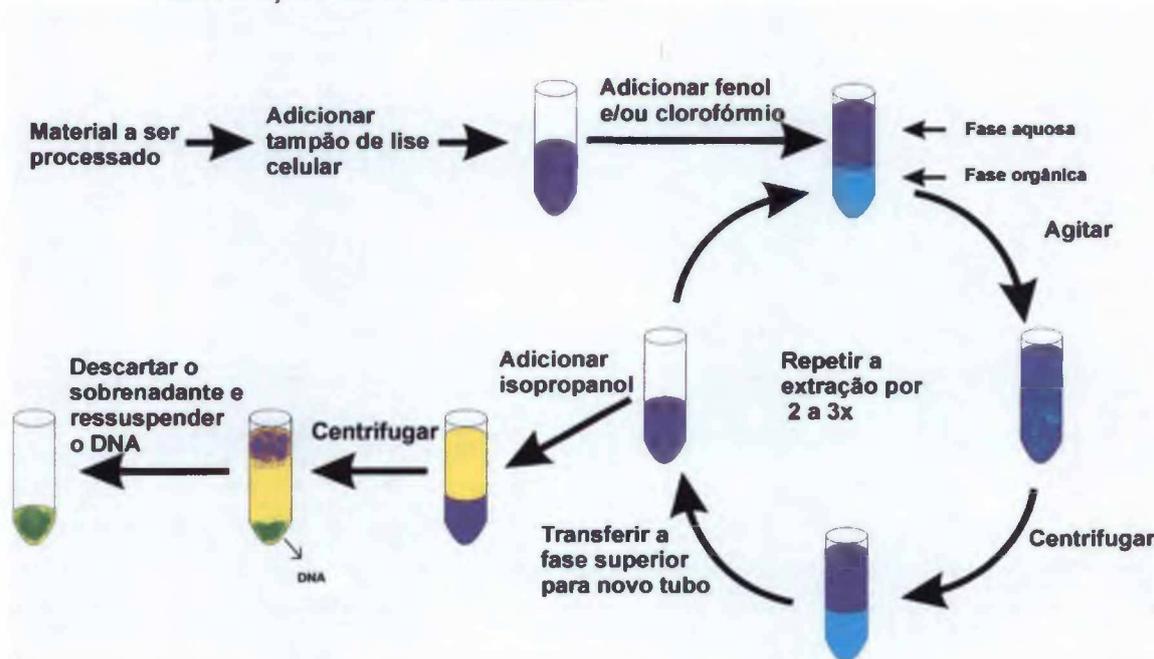
2.6.2 Extração e Análise de DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA) pode ser estudado, dentro da célula, diretamente nos cromossomos, por meio de técnicas que localizam seqüências específicas de ácidos nucléicos *in situ* (hibridação *in situ*); assim como, pode ser analisado isoladamente, isto é, apenas a molécula de DNA. Para a análise do isolado, é necessário, primeiro, separar os componentes celulares em frações purificadas. Essa separação é possível devido às propriedades como a solubilidade diferencial, de cada macromolécula (RNA, DNA, proteína, lipídio e outros), que possibilita a obtenção de uma preparação que contenha apenas DNA (FERREIRA, 2000).

A grande maioria dos protocolos de extração de DNA genômico de bactérias, células de plantas ou de mamíferos envolvem, via de regra, cinco etapas básicas (FIGURA 10). Algumas modificações dos protocolos ocorrem visando resolver problemas referentes à espécie em estudo. Na primeira, é promovido o rompimento de parede e membranas celulares. Na segunda, o material é ressuspensionado em um tampão de extração contendo detergente, ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e agentes tamponantes, visando à solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas, enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Na terceira, essa suspensão é submetida a uma extração com um solvente orgânico. As fases orgânica e aquosa são separadas por centrifugação. Nessa etapa, contaminantes como proteínas, lipídeos e outras macromoléculas, são retidos na fase orgânica (inferior), enquanto que o DNA, RNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase aquosa (superior). A solução aquosa é então tratada com ribonuclease pancreática (RNase) ou centrifugada em gradiente de cloreto de cério (CsCl) para a remoção do RNA. Na quarta etapa, um álcool (Ex.: isopropanol ou etanol) é adicionado à fase aquosa. O DNA na presença de sal e álcool forma um precipitado, freqüentemente, visível, que pode ser retirado ou sedimentado por centrifugação. Após lavagens do precipitado com álcool, na última etapa, o precipitado de DNA é ressuspensionado em tampão Tris-EDTA.

Freqüentemente, torna-se necessária a purificação ou a concentração da solução de DNA antes de estudos analíticos ou de manipulação enzimática.

FIGURA 10 - ESQUEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS BÁSICAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO



FONTE: FERREIRA (2000)

2.6.3 Detecção e Quantificação de DNA

Vários são os métodos utilizados na quantificação de DNA:

- Método de quantificação por meio de fluorímetro – baseia-se na adição de um composto, o DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole), à solução de DNA, e na quantificação do DNA com base na emissão de fluorescência por este composto. Quanto maior a fluorescência emitida, maior a concentração de DAPI associada ao DNA, portanto, maior a concentração de DNA.
- Outro método baseia-se na propriedade da molécula do DNA em absorver radiação UV (ultravioleta) ao comprimento de onda de 260 nm. A relação absorvância 260 nm/absorvância 280 nm de uma amostra de DNA fita dupla pode ser usada para avaliar sua pureza. Para o DNA puro, o valor é 1,8. Valores acima sugerem contaminação por RNA e, valores abaixo, contaminação por proteína.
- Análise comparativa de amostras coradas com brometo de etídio em géis de agarose. A técnica consiste de uma seqüência crescente de concentrações de solução padrão de DNA, pareadas, em gel de agarose, nas quais se compara uma amostra de

concentração desconhecida de DNA. A estimativa das concentrações das amostras é então feita sob luz UV, com base na fluorescência emitida pela molécula de DNA, após o gel ser tratado com brometo de etídio. Este é uma substância intercalante, largamente utilizada na revelação do DNA, pois se combina firmemente com a molécula de DNA de dupla fita.

2.6.4 Eletroforese

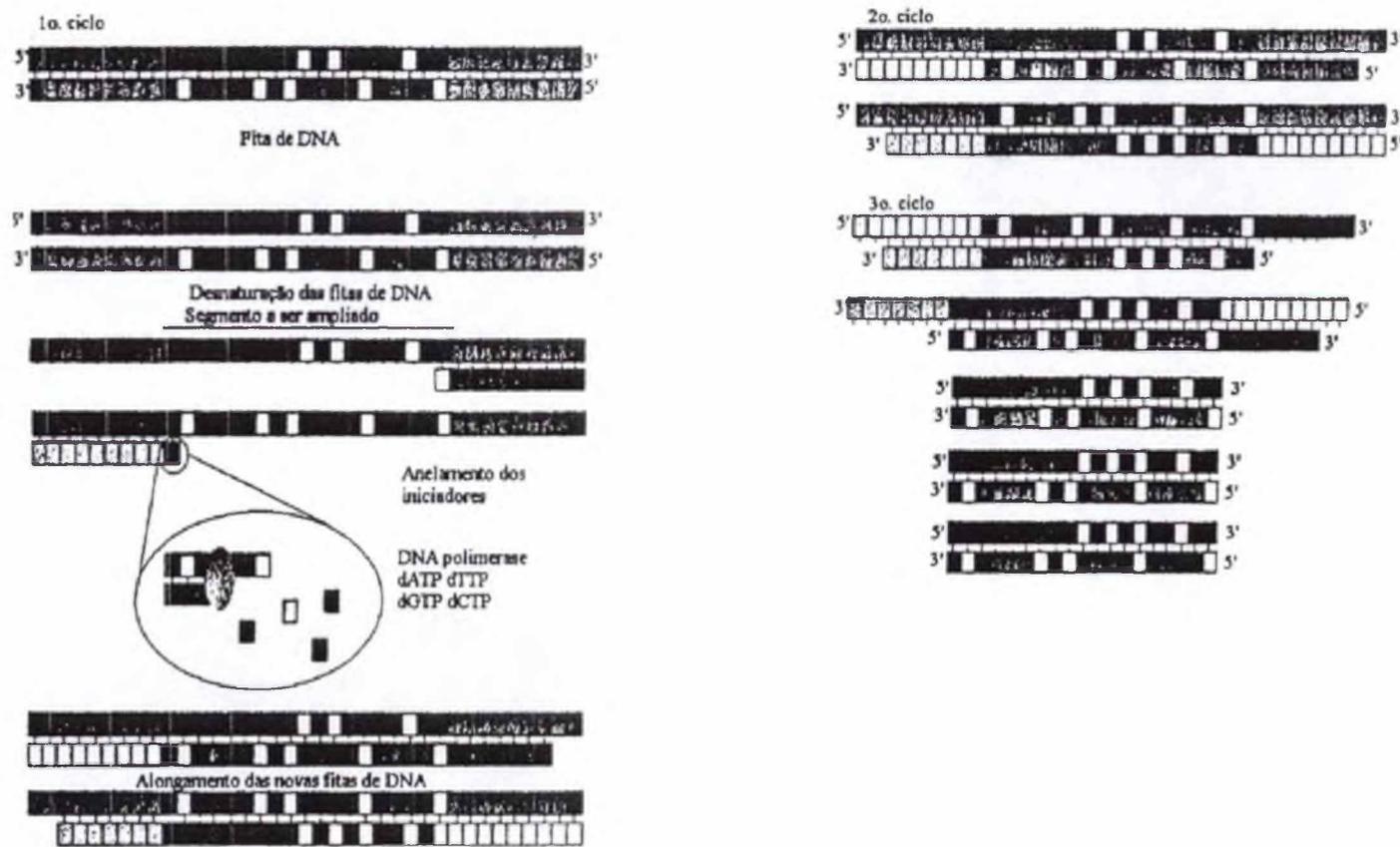
A eletroforese baseia-se na movimentação de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucléicos e outras) por meio de uma matriz tamponada (amido, agarose, acrilamida). A matriz funciona como um filtro, separando as moléculas de acordo com o tamanho e/ou carga elétrica líquida que possuem quando submetidas a um campo elétrico. Nos ácidos nucléicos, o grupo fosfato é responsável pela forte carga negativa em condições de pH neutro (tampão Tris-EDTA-Acetato (TAE)), fazendo com que os fragmentos migrem para o pólo positivo (ânodo) durante a eletroforese. Como a carga elétrica líquida dos fragmentos é negativa, a separação ocorrerá com base no tamanho destes.

A separação de fragmentos de DNA de 60 pares de bases (pb) a 100 pb pode ser verificada, eficientemente, utilizando agarose (uma forma purificada de ágar extraído de algas marinhas). As moléculas de ácido nucléico migram através dos poros do gel, com velocidade dependente de seu peso molecular e de sua forma. Pequenas ou compactas moléculas migram mais rápido que moléculas grandes ou relaxadas. Alguns fatores importantes afetam a migração dos ácidos nucléicos no gel; dentre eles, a conformação do ácido nucléico, o tamanho dos poros do gel, a corrente aplicada e a concentração de sal no tampão (FERREIRA, 2000).

2.6.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método *in vitro* de síntese enzimática de uma seqüência específica de DNA, ou seja, permite amplificar um número de cópias de um determinado fragmento de DNA de interesse, gerando milhões de cópias exatas de um fragmento de DNA a partir de, tão somente, uma cópia original em apenas duas ou três horas. Nessa síntese são utilizadas duas seqüências de oligonucleotídeos (*primers*) que hibridizam-se nas fitas opostas de DNA e flanqueiam a região do DNA a ser amplificada. A série repetida de ciclos que envolvem a desnaturação do DNA, que contém a seqüência a ser amplificada, anelamento do *primer* e extensão do *primer* anelado pela DNA polimerase resulta em acúmulo exponencial do fragmento específico de DNA (FIGURA 11).

FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA



FONTE: MADRUGA (2000)

Os produtos sintetizados em cada ciclo atuam como molde no próximo ciclo, por isso, o número de seqüências ampliadas duplica após cada ciclo. Portanto, em um programa que tem vinte ciclos, a amplificação é de 2^{20} .

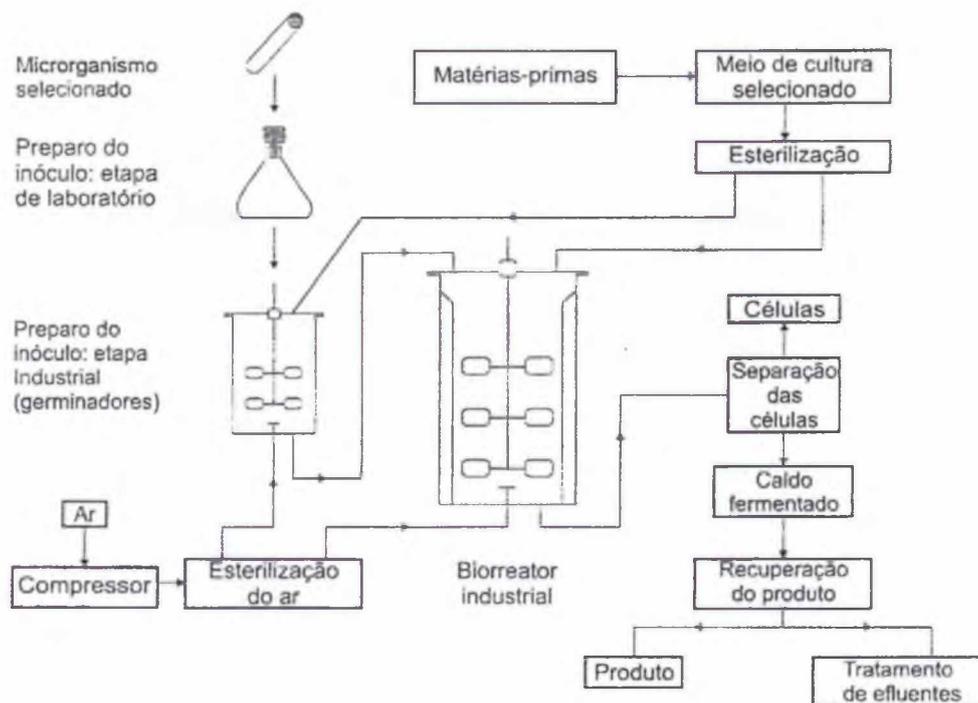
Um ponto crucial na PCR são os *primers*. Só haverá amplificação de DNA, se houver hibridação do *primer* com a região do DNA a ser amplificada. Este quesito confere especificidade à reação, pois entre as inúmeras seqüências de DNA de uma amostra, somente será amplificada aquela que possuir regiões complementares aos *primers* utilizados (MADRUGA, 2000).

2.7 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Os microrganismos e meios de cultura devem apresentar características desejáveis para que seja possível o estabelecimento de processo produtivo em larga escala. Conforme pode-se observar na FIGURA 12 o sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto.

A fermentação é o processo pelo qual os carboidratos e substâncias similares oxidam, liberando energia na ausência de aceptores externos de elétrons (O_2). Neste processo, as alterações químicas produzidas no substrato orgânico são ocasionadas pelas enzimas elaboradas pelos microrganismos fermentadores (JAY, 1994; MACEDO, 1997).

FIGURA 12 - ESQUEMA GERAL DE UM PROCESSO FERMENTATIVO



FONTE: SCHMIDELL (2001)

2.7.1 Características Desejáveis aos Microrganismos

Para uma aplicação industrial espera-se que os microrganismos apresentem as seguintes características gerais:

- apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;
- permitir o acúmulo do produto no meio de forma a ter elevada concentração do produto no caldo fermentado;
- não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- não ser patogênico;
- não exigir condições de processo muito complexas;
- não exigir meios de cultura dispendiosos;
- permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Uma célula deve permitir elevada conversão do substrato em produto, pois com muita frequência, as matérias-primas incidem pesadamente no custo do produto final, podendo mencionar uma incidência de 38 a 73% do custo total de produção, como sendo, devido às matérias-primas, em particular, a fonte orgânica de carbono.

Por outro lado, é sempre desejável que o microrganismo permita um elevado acúmulo do produto no meio, sem sofrer inibição mais acentuada em virtude deste acúmulo, pois isto concorre a uma redução nos custos de recuperação, os quais também podem ser muito acentuados.

Uma outra característica, da mais alta importância, refere-se à estabilidade fisiológica da linhagem a ser empregada industrialmente. Isso significa que não basta ter uma linhagem hiperprodutora de uma dada substância de interesse, mas conhecer as técnicas mais adequadas para a sua conservação e, além disso, mantida como excelente produtora da substância de interesse ao longo de todas as etapas envolvidas, desde sua proliferação em nível de laboratório, germinadores e biorreator principal.

Um microrganismo também não deve exigir condições de processo muito complexas, por motivos claros de economicidade da produção. O ideal é que o microrganismo tenha uma faixa de valores ótimos de pH e temperatura e não valores pontuais, particularmente no que se refere ao acúmulo do produto. Nessa direção, são igualmente muito interessantes os microrganismos que conseguem manter um bom desempenho, quando cultivados em baixas concentrações de oxigênio dissolvido (SCHMIDELL, 2001).

2.7.1.1 Princípios do crescimento microbiano

O crescimento de microrganismos pode ser avaliado pelo aumento da massa celular ou pelo número de células e, é o resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados. A expressão máxima do crescimento microbiano é dependente do transporte dos nutrientes necessários, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, que se transferem à célula (transferência de

massa) e de parâmetros ambientais, como temperatura e pH, que devem ser mantidos no valor ótimo.

Os aspectos que devem ser observados, ao se projetar uma produção de microrganismos, processo de produção massal, dizem respeito ao microrganismo em si, aos substratos nutricionalmente importantes para o desenvolvimento desses microrganismos e aos processos que serão utilizados na produção e na recuperação. Isso também leva em conta parâmetros e variáveis do processo para otimização e ampliação de escala. Envolve ainda as análises, ou seja, a metodologia de acompanhamento das fases de crescimento, de produção de metabólitos primários ou secundários, do processo como um todo, incluindo a separação e a formulação.

Para um processo economicamente viável, dependendo do sistema, é desejável isolar linhagens que demandem curtos tempos de fermentação, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indesejáveis, tenham exigência de aeração reduzida, exibam formação de espuma decrescente durante o processo de fermentação, ou que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo (SCHMIDELL,2001).

2.7.1.2 A curva de crescimento microbiano

Após a inoculação de um meio de cultura favorável ao desenvolvimento do microrganismo em estudo, sob temperatura controlada e agitação adequada, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular.

As seguintes fases no crescimento são observadas:

Fase 1 – conhecida como fase lag ou de latência. Segue-se imediatamente após a inoculação do meio com o microrganismo em questão. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio.

Durante essa primeira fase, não há reprodução celular e, assim, X (concentração de biomassa) = X_0 (concentração inicial de biomassa) = constante.

A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inóculo (e, portanto, com o valor de X_0), com a idade do microrganismo (tempo de pré-cultivo) e com o seu estado fisiológico.

Com efeito, se as células forem pré-cultivadas em um meio de composição diferente, o tempo referente ao fenômeno de indução pode ser apreciável; caso contrário, é possível que tal fase não exista.

Fase 2 – Essa é a fase de transição onde se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita.

Há um aumento gradual, tanto da velocidade de reprodução, como da velocidade específica de crescimento, onde nem todos os microrganismos completam a fase anterior simultaneamente. No fim dessa fase, a população inteira começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo.

Fase 3 – É denominada fase logarítmica ou exponencial, onde a velocidade específica de crescimento ($\mu_X = \mu_M$) é constante e máxima. Onde: μ_X (velocidade específica de crescimento) e μ_M (máxima velocidade específica de crescimento ou reprodução).

Fase 4 – Conhecida como fase linear de crescimento por apresentar a velocidade de reprodução constante. Essa fase pode ocorrer sem a prévia existência da fase logarítmica, como é o caso de microrganismos filamentosos, onde há limitação no transporte de nutrientes do meio para o interior da célula.

Fase 5 – Desaceleração. Devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura, necessários ao crescimento e, também, devido ao acúmulo de metabólitos inibidores, ambas as velocidades - de crescimento e específica - diminuem até se anularem, no tempo t_f (tempo final da fermentação).

Fase 6 – Estacionária. Nessa fase, X atinge o valor máximo e constante X_M (concentração máxima de biomassa), onde há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microrganismo, ocorrendo também modificações na estrutura bioquímica da célula.

Fase 7 – Declínio ou lise. O valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas. Ocorre, durante o declínio,

uma *lise* celular, autólise ou rompimento dos microrganismos, provocada pela ação de enzimas intracelulares (HISS, 2001).

2.7.1.3 Cinética de processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entendem-se como componentes o microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura.

2.7.2 Características Desejáveis de Meios de Cultivo

O desempenho de um dado microrganismo depende muito da composição do meio de cultura em que é cultivado.

Algumas características gerais que devem ser consideradas:

- de baixo custo;
- atender às necessidades nutricionais do microrganismo;
- auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, para evitar variações drásticas de pH, ou evitar uma excessiva formação de espuma;
- não prejudicar a recuperação do produto;
- os componentes devem permitir algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo;
- ter composição razoavelmente fixa;
- não causar dificuldades no tratamento final do efluente.

Todas essas são características importantes, destacando-se o custo do meio de cultura, que deve ser o menor possível e atender às necessidades do microrganismo selecionado.

Os microrganismos utilizam como fonte de carbono e, freqüentemente, de energia, diversos açúcares, tais como: glicose, sacarose, frutose ou ainda

polissacarídeos como o amido e a celulose. Como fontes de nitrogênio são freqüentemente utilizados sais, como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - o qual costuma provocar reduções significativas do pH e, em alguns casos, fenômenos de inibição pelo sulfato -, o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ou aminoácidos, ou a uréia - a qual permite reduzir os problemas de controle do pH. Como fontes de fósforo utilizam-se os fosfatos solúveis, como o monoamônio fosfato (MAP), ou diamônio fosfato (DAP), os quais passam a ser fontes de nitrogênio e fósforo simultaneamente. Ainda necessita-se adicionar outros elementos, como: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn, Co etc., em concentrações freqüentemente muito reduzidas, na forma de seus sais solúveis.

Os meios de cultura constituídos apenas por essas substâncias costumam ser chamados de meios definidos, ou meios sintéticos, cuja composição química é sempre muito bem conhecida e pode ser reproduzida a qualquer instante. Por essa razão, para as células que apresentam bom desempenho em meios desse tipo, espera-se a ocorrência de um sistema produtivo muito estável, além de, em geral, não apresentarem problemas quanto à recuperação e purificação do produto final. Esses meios, sendo mais onerosos, podem ser preferidos, caso realmente permitam uma maior economia nas etapas de recuperação do produto.

No entanto, para uma grande variedade de linhagens, há a necessidade da adição de certos fatores de crescimento, ou seja, alguns aminoácidos específicos ou vitaminas (como a biotina, tiamina e riboflavina). Quando se conhecem essas necessidades específicas, é possível adicionar substâncias puras, a fim de manter o meio em sua forma mais definida, mas o custo destes meios pode tornar-se inviável, particularmente para instalações de grande porte, a menos que isto signifique um enorme ganho econômico na recuperação do produto, ou preserve alguma característica fundamental deste produto, necessariamente de alto valor agregado.

Alternativamente, para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com características nutricionais mal conhecidas, podem-se adicionar certos materiais complexos como: extrato de levedura (autolisado de leveduras), extrato de carne, extrato de malte e peptona (hidrolisado de proteínas). Esses materiais (individuais ou adicionados conjuntamente) permitem introduzir no meio de cultura os

fatores faltantes em um meio definido, mas além de onerosos, são complexos e de composição variável ao longo do tempo de armazenagem e na dependência do fabricante e do lote empregado. Assim, pode-se imaginar a ocorrência de oscilações no processo fermentativo, além de possíveis dificuldades nas operações de recuperação do produto final, dependendo das características deste produto e das operações de recuperação.

É freqüente observar nos trabalhos básicos de isolamento ou seleção de linhagens, o emprego de meios contendo quantidades muito grandes desses extratos ou hidrolisados (vários gramas por litro, ou mesmo dezenas de gramas por litro). Dessa forma, no desenvolvimento do processo produtivo, uma das tarefas iniciais é verificar a possibilidade da obtenção de iguais desempenhos, porém em meios isentos desses materiais, ou com a adição de quantidades mínimas, tendo em vista o custo envolvido.

Na direção dos meios menos complexos e, igualmente, menos onerosos, razão pela qual são empregados na maioria dos processos fermentativos em grande escala, cumpre mencionar o uso de matérias-primas naturais, subprodutos naturais de baixo custo, resíduos e águas residuárias com boa composição e em disponibilidade.

As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glicose (glicose pura, amido hidrolisado), lactose (lactose pura, soro de leite ou queijo, em pó), amido ou fécula (cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo) e sacarose (melaço de cana (MACHADO, 2001), de beterraba, açúcar demerara, açúcar refinado). As fontes nitrogenadas, cujo teor médio apresentado, podem ser: cevada (1,5 a 2,0%), melaço de beterraba (1,5 a 2,0%), água de maceração de milho (*corn steep liquor*) (4,5%), farinha de aveia (1,5 a 2,0%), farinha de centeio (1,5 a 2,0%), farelo de soja (8,0%), soro de leite (pó) (4,5%). Os traços de metais necessários geralmente estão presentes na água corrente ou na maioria das matérias-primas.

Essas matérias-primas são de composição química desconhecida e, meios de cultura contendo esses materiais naturais, com freqüência, são completados com alguns sais (particularmente contendo nitrogênio e fósforo). A composição química destas matérias-primas está na dependência de uma série de fatores, tais como solo,

variedade do vegetal, safra, clima, processamento durante a colheita e estocagem (SCHMIDELL, 2001).

O adequado balanço de C/N pode ser fundamental, especialmente se o pH não for controlado.

A composição de meios de cultivo deve levar em conta a composição elementar do microrganismo (TABELA 3) a ser cultivado e sua capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultivo em massa celular ou outros produtos desejados. O uso de um determinado nutriente em quantidade menor que a desejada vai provocar limitação da ação microbiana. Por outro lado, o uso desse nutriente em quantidade maior que um determinado valor, poderá provocar inibição dessa ação (SCHMIDELL, 2001).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR TÍPICA DE MICRORGANISMOS

Elemento	Porcentual da célula seca
Carbono	50
Nitrogênio	7-12
Fósforo	1-3
Enxofre	0,5-1,0
Magnésio	0,5

FONTE: SCHMIDELL (2001)

2.7.2.1 Cana-de-açúcar, fonte de matéria prima para cultivo de células microbianas

2.7.2.1.1 Panorama da produção de cana-de-açúcar

A cana é cultivada em mais de 100 países sendo o Brasil o maior produtor do mundo, seguido por Índia e Austrália.

Na média, 55% da cana brasileira vira álcool e 45%, açúcar. Planta-se cana no centro-sul e norte-nordeste, o que permite dois períodos de safra, produz-se, portanto, o ano todo. O maior produtor nacional de cana é o estado de São Paulo, que detém

59% da produção, em segundo aparecem os estados do Paraná com 7,8% e Alagoas com 6,9% (PISSAIA, 1998).

2.7.2.1.2 Origem da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea, perene, própria de climas tropicais e subtropicais, pertencente ao gênero *Saccharum*. Há várias espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, entre outros), mas as variedades utilizadas hoje são quase todas híbridas. Nelas procura-se aliar a rusticidade de algumas espécies, como a *S. spontaneum*, às boas qualidades das variedades nobres de *S. officinarum* (FIGURA 13) (GOMES; LIMA, 1964).

FIGURA 13 - *Saccharum officinarum*



FONTE: PAVONE (2004)

A origem presumível da cana-de-açúcar é o norte da Índia. Há referência ao açúcar datada do ano 500 d.C.. No Egito, no século IX e X, a produção de açúcar teve grande importância na economia do país, havendo exportação desse produto. Os árabes levaram a cana para o norte da África e sul da Europa e os chineses para Java e

Filipinas. Nos séculos XI e XII as cruzadas levaram o açúcar para toda Europa e, assim, propagaram seu comércio e uso.

Colombo em sua segunda viagem trouxe a cana à América, começando o seu plantio em São Domingos (República Dominicana) em 1494. No Brasil, o plantio iniciou-se em São Vicente em 1522, com a cana trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Sousa. O ciclo do açúcar provocou a introdução, no Brasil, dos escravos africanos trazidos pelos portugueses (BASTOS, 1987).

2.7.2.1.3 Definição de açúcar

A resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, ANVISA, Ministério da Saúde, define açúcares como todos os monossacarídeos e dissacarídeos presentes em um alimento que são digeridos, absorvidos e metabolizados pelo ser humano. Não se incluem os polióis (BRASIL, 2003).

A resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001). O QUADRO 3 apresenta o grupo de alimento açúcares, adoçantes e similares, os microrganismos e tolerância para amostra. Para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se:

a) m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável;

b) M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis;

c) n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos em que o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo);

d) c : é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual à zero, aplica-se o plano de duas classes.

Tipos de plano:

a) duas classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável ou inaceitável, em função do limite designado por M , aplicável para limites qualitativos;

b) três classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável, em função dos limites m e M . Além de um número máximo aceitável de unidades de amostra com contagem entre os limites m e M , designado por c . As demais unidades, n menos c , devem apresentar valores menores ou iguais a m . Nenhuma das unidades n pode apresentar valores superiores ao M .

QUADRO 3 - GRUPO DE ALIMENTO AÇÚCARES, ADOÇANTES E SIMILARES, OS MICRORGANISMOS E TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA

GRUPO ALIMENTO	MICRORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
AÇÚCARES, ADOÇANTES E SIMILARES						
a) açúcar refinado, sólido (moído, em grânulos e similares) ou líquido	Coliformes a 45°C/g (mL)	5	5	2		5
b) açúcar cristal não refinado, açúcar mascavo e demerara, melado, melaço e rapadura e similares	Coliformes a 45°C/g (mL)	10 ²	5	2	10	10 ²
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
c) edulcorantes, adoçantes de mesa e similares, em pó, líquido ou comprimidos	Coliformes a 35°C/g (mL)	2	5	1		2

FONTE: BRASIL (2001)

NOTA: Aus: ausência.

2.7.2.1.4 Composição química do fruto agrícola da cana

O colmo, fruto agrícola da cana, no qual se acumula a sacarose no período de maturação, compõe-se de fibra, em média 10%, e caldo, 90%. No caldo encontramos água (75 a 82%) e sólidos totais (18 a 25%). Estes são compostos de açúcares (15,5 a 24%) e de não açúcares (1 a 2,5%). De maneira geral, sua composição química é

resultante da interação de vários fatores, chegando a divergir dentro de uma mesma região, em diferentes anos, variando especialmente com as condições climáticas, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, o tipo de cultivo empregado, a variedade e a idade da cana, irrigação ou irrigação fertilizada (vinhaça), intensidade de desponte, estágio de maturação, condições e tempo de armazenamento na usina (PISSAIA, 1998).

O QUADRO 4 mostra a composição química do colmo da cana-de-açúcar normal, sadia e madura e as suas variações percentuais.

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO COLMO DE CANA MADURA, NORMAL E SADIA
(DADOS EM PORCENTAGENS)

Água	
74,50 (65-75)	
Açúcares	Sacarose 12,5 (11-18)*
14,00 (12-18)	Glicose 0,9 (0,2-1,0)
	Frutose 0,6 (0,0-0,6)
Fibras	Celulose 5,50
10 (8-14)	Lignina 2,00
	Pentosana (xilana) 2,00
	Goma de cana (arabana) 0,50
Cinzas	SiO ₂ 0,25
0,5 (0,4-0,8)	K ₂ O 0,12
	P ₂ O ₅ 0,07
	CaO 0,02
	SO ₃ 0,02
	Na ₂ O 0,01
	MgO 0,01
	Cl traços
	Fe ₂ O ₃ traços
Matérias nitrogenadas	Aminoácidos (como ácido aspártico) 0,20
0,40 (0,30-0,60)	Albuminóides 0,12
	Amidas (como asparagina) 0,07
	Ácido nítrico 0,01
	Amoníaco traços
	Corpos xânticos traços
Gorduras e ceras	
0,20 (0,15-0,25)	
Pectina	
0,20 (0,15-0,25)	
Ácidos combinados	Málico
0,12 (0,10-0,15)	Succínico, etc.
Ácidos livres	Málico
0,08 (0,06-0,10)	Succínico, etc.
Matérias corantes (não dosadas)	Clorofila
	Antocianina
	Sacaretina e polifenóis

FONTE: GOMES; LIMA (1964); LIMA et al (2001)

NOTA: * Os números entre parênteses representam os limites de variação

2.7.2.1.5 Processo de produção de açúcar mascavo (cru)

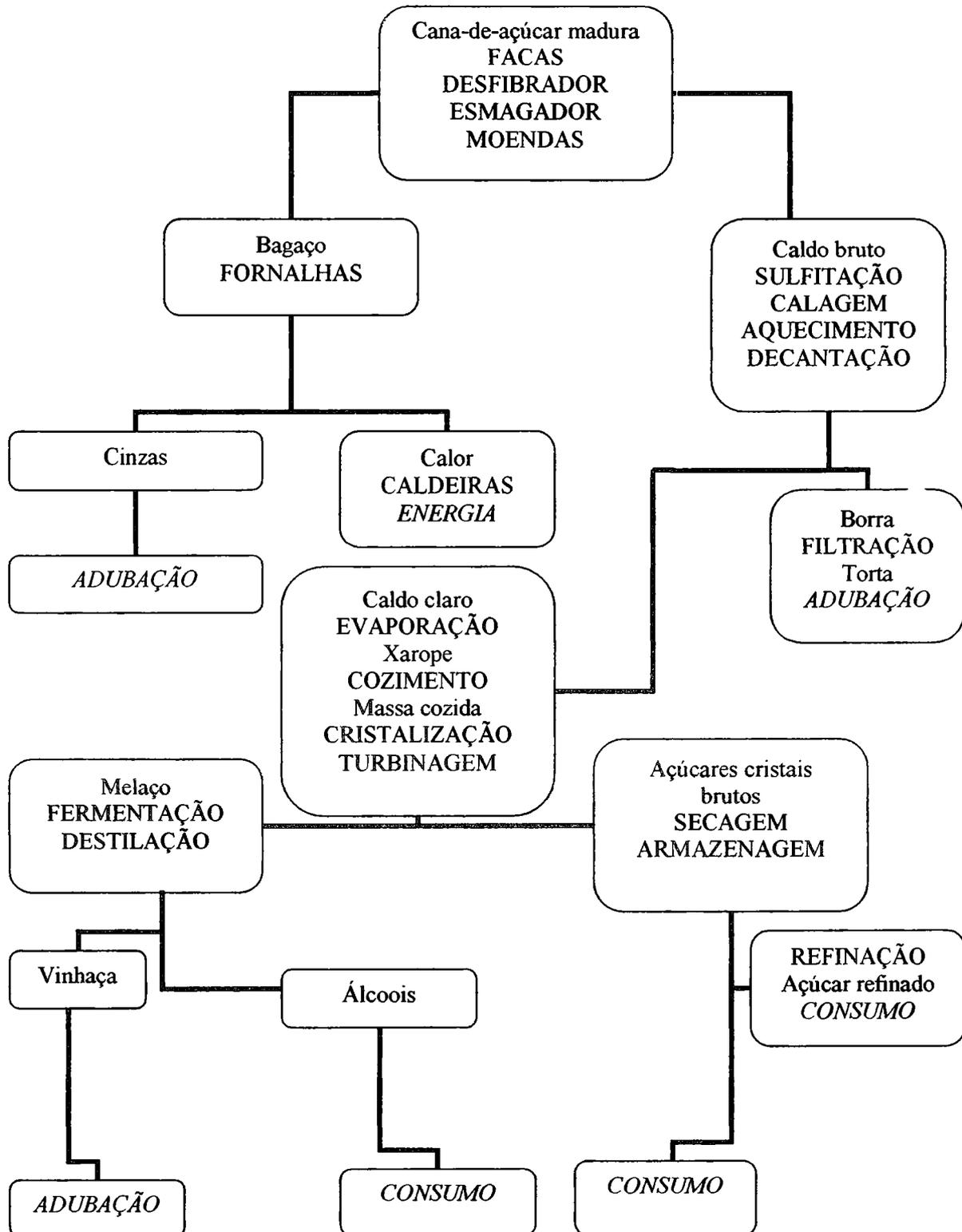
A principal finalidade da cana-de-açúcar como matéria prima é , sem dúvida, na indústria do açúcar. A cana recebida pela usina, enfeixada ou não, representa, sempre, um volume muito grande de material, o que, devido ao seu emaranhamento, traria seriíssimas dificuldades para a alimentação da primeira unidade esmagadora. Daí, uma das necessidades do preparo da cana antes da extração do caldo. Este preparo consiste em reduzir o colmo a pequenos pedaços ou mesmo em fibras, diminuindo assim o volume de material e facilitando a alimentação das moendas. Estando o caldo contido em células, a ruptura destas pela ação do preparo facilita, sobremaneira, a sua extração.

Na prática, esta operação é realizada por meio de facas rotativas, desfibradores ou esmagadores.

A extração do caldo é feita, de modo geral, fazendo-se a cana preparada passar através de sucessivos jogos de moendas. A proporção de caldo produzido pela moagem varia de 50 a 100% do peso da cana, isto é, uma tonelada produz de 500 a 1000 litros de caldo; comumente admite-se a média de 850 litros. O caldo extraído (bruto) é ácido, opaco e turvo e mediante tratamento químico com cal e aquecimento é neutralizada a acidez e precipitam compostos principalmente de natureza coloidal, que são separados por sedimentação. Dessa forma o caldo se torna neutro, transparente e limpo (suco clarificado). O resíduo deste processo é a torta.

Na concentração do caldo - processo de evaporação – elimina-se uma quantidade de água equivalente a 75 ou 78% do peso do suco e se obtém mel rico. Este é submetido à evaporação em cozedores a vácuo, até um grau apropriado de sobresaturação para que se produza a cristalização da sacarose. Pelo processo de centrifugação temos a separação do açúcar, açúcar mascavo, do produto residual, o melaço (FIGURA 14).

FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR DE CANA-DE-AÇÚCAR



FONTE: LEME; BORGES (1965)

2.7.2.1.6 Açúcar mascavo

O produto adoçante, conhecido como açúcar mascavo, era até o século passado o principal derivado da cana-de-açúcar e o Brasil era o principal produtor mundial. A partir do início do século XX, a produção desse tipo de açúcar declinou, sendo substituída gradativamente pelos açúcares brancos, cristal ou refinado. Na década de 50, a produção de mascavo tornou-se insignificante, sendo produzido artesanalmente somente para o consumo doméstico do próprio produtor, não mais com vistas à comercialização. Na década de 90, a procura de produtos naturais por pessoas preocupadas com a qualidade do alimento aumentou bastante, a demanda pelo açúcar mascavo então ressurgiu e sua produção voltou a crescer. O açúcar mascavo é constituído por aglomerados de sacarose, glicose, frutose e demais substâncias provenientes do caldo extraído da moagem da cana-de-açúcar, e que são formados após o resfriamento do xarope altamente concentrado (SEBRAE, 2005). Na sua fabricação não é utilizado nenhum produto químico para clarificação do caldo, exceto pela adição de leite de cal por alguns produtores.

Como o açúcar mascavo não passa pela etapa de refinamento ele conserva as vitaminas e os sais minerais. No refinamento, aditivos químicos como o enxofre, tornam o produto branco, porém este processo retira vitaminas e sais minerais, deixando apenas as "calorias vazias" (sem nutrientes) (PAQUETE, 2005). O QUADRO 5 apresenta análise comparativa entre o açúcar refinado e o mascavo em relação a sua composição química.

QUADRO 5 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O AÇÚCAR COMUM REFINADO E O AÇÚCAR MASCADO EM RELAÇÃO À SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (VALOR POR 100 g)

Constituinte	Açúcar refinado	Açúcar mascado
ENERGIA (kcal)	398,0	356,0
GLICÍDEOS (g)	99,5	90,6
PROTEÍNAS (g)	ZERO	0,40
LIPÍDEOS (g)	ZERO	0,50
CÁLCIO (mg)	ZERO	51,0
FERRO (mg)	ZERO	4,2
FÓSFORO (mg)	ZERO	44,0

FONTE: BRASÍLIA (2005)

O açúcar mascado deverá conter um mínimo de 90% de sacarose. Segundo levantamento das características físico-químicas das amostras analisadas de açúcar mascado por Manieri, Lopes e Borges (2004), os teores em sacarose aparente varia de um mínimo de 69,5% a um máximo de 92,1%, açúcares redutores de 1,9 a 18,8%, teor de potássio entre 288 a 11 750 mg.Kg⁻¹, teor de sódio entre 1,3 a 45,9 mg.Kg⁻¹, teor de ferro entre 13,2 a 122,5 mg.Kg⁻¹. Os resultados de umidade mostraram valores entre 1,7 a 10,1% com média de 4,5%.

O açúcar mascado (cru) pode conter um teor de 97 a 98% de sacarose, com o máximo esgotamento possível do melaço (ICIDCA,1999).

2.8 PROCESSAMENTO DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS PARA USO COMO PROBIÓTICOS

Um problema comum nas preparações de bactérias ácido lácticas é encontrar, prematuramente, um número de bactérias viáveis consideradas menores que o exigido. O número de microrganismos administrados como doses terapêuticas são freqüentemente 10^9 a 10^{12} /animal/dia ou 10^6 a 10^7 /g alimento. Doses altas com bactérias ácido lácticas podem ter um efeito laxativo em suínos (JONSSON; CONWAY, 1992).

Para uma maior estabilidade do probiótico, usa-se a liofilização, cujo objetivo é produzir a remoção da água intracelular das bactérias, reduzindo ao mínimo sua atividade metabólica, aumentando assim a longevidade do produto. A liofilização é obtida pelo congelamento do conteúdo intracelular e a subsequente remoção da umidade pela membrana celular sob vácuo, mantendo-se a integridade da maioria das células. Neste processo, desenvolve-se a bactéria em um meio de cultura estéril, até atingir o final da fase exponencial de crescimento, ou o início da estacionária. Paralisa-se o processo fermentativo; as células bacterianas são coletadas por centrifugação, ressuspensas em leite desnatado estéril ou soro de cavalo contendo 7,5% (p/v) de glicose, congela-se rapidamente a cultura entre -20 e -30 °C, seguida por secagem a vácuo a temperaturas inferiores a -30 °C. As ampolas são seladas a vácuo e estocadas a 5-8 °C (KANDLER; WEISS, 1989). O material final é um pó, com no máximo 3% de umidade residual e com uma contagem bacteriana muito próxima da contagem da cultura original. Muitas espécies são preservadas por este método e são viáveis depois de 10-20 anos. Muitas espécies podem ser guardadas por longos períodos (mais de 30 anos) em nitrogênio líquido (LIMA et al, 2001).

A preservação de lactobacilos por processos que envolvem congelamento, liofilização e ar seco, podem resultar em danos fisiológicos e estruturais das células bacterianas, elevando em perda substancial da viabilidade.

Fuller (1992) cita que, em geral, os lactobacilos são insensíveis ao congelamento e estocagem a -20 °C ou abaixo, mas são menos resistentes a

liofilização e especialmente em secagem por pulverizador (*spray-drying*). Dziezak (1988) e Fuller (1992) sugerem o encapsulamento de microrganismos em caso de estocagem sob longos períodos e/ou sob condições não favoráveis. O método e o material de parede para o encapsulamento são fatores que influenciam a sobrevivência de *Lactobacillus reuteri* durante o processamento do alimento e durante a passagem do trato gastrintestinal (MUTHUKUMARASAMY; BUFFO; HOLLEY, 2005).

Em investigações anteriores foi demonstrada a eficiência de certos compostos – adonitol, β -glicerofosfato, polietilenoglicol, entre outros – como crioprotetores durante a liofilização de bactérias ácido lácticas. Entretanto, muitos destes compostos não podem ser usados no meio de suspensão quando se preparam culturas iniciais na indústria alimentícia, pois em muitos países é proibida a adição de algumas substâncias que não estejam naturalmente presente na matéria-prima (VALDEZ; DIEKMANN, 1993).

Valdez e Diekmann (1993) sugerem o uso de 20% de farinha de centeio com 5% de glutamato monossódico como um meio efetivo para o preparo de culturas iniciais em massas azedas, pela importância econômica - curto tempo de secagem e alta sobrevivência na liofilização depois de estocagem em temperatura ambiente.

Investigações iniciais realizadas com a bactéria *Escherichia coli* tem demonstrado a habilidade em adaptar-se em meio não favorável pela indução a respostas à estresses gerais e específicos. A sobrevivência desta bactéria sobre condições adversas é freqüentemente aumentada por estes mecanismos. Diferentes respostas para tratamentos diferentes de estresses (por exemplo: aquecimento, baixo pH e choque osmótico) tem sido descrito. Estas respostas ao estresse são caracterizadas pela indução de proteínas transitórias gerais e específicas, e por mudanças fisiológicas que, geralmente, aumentam a habilidade do organismo a resistir à condições ambientais adversas (PRASAD; McJARROW; GOPAL, 2003).

Prasad, Mcjarrow e Gopal (2003) observaram que espécies de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) quando eram submetidas às condições adversas de aquecimento (50 °C) ou sal (0,6 M NaCl) melhoraram significativamente a viabilidade

comparado com o controle (culturas não submetidas ao estresses) depois de estocagem a 30 °C na forma seca.

Barreto et al (2003) citam a microencapsulação, a seleção de cepas mais resistentes, a pré-adaptação das cepas às condições de estresse e a adição de micronutrientes e agentes redutores como alternativas para elevar a taxa de sobrevivência dos microrganismos em produtos probióticos.

2.9 PROGRAMAS DE ALIMENTAÇÃO DE SUÍNOS COM O USO DE PROBIÓTICO

O melhoramento genético, aliado aos avanços da nutrição e manejo, tem contribuído para melhorias significativas de produtividade na suinocultura, refletindo em um produto final de qualidade, saudável e altamente nutritivo, redundando no evidente favorecimento ao consumidor final.

Os probióticos estão sendo usados em animais de produção como substitutos dos antibióticos na prevenção de infecções intestinais, promovendo a velocidade de crescimento, ganho de peso e aumento da eficiência da conversão alimentar. Tem-se demonstrado que o balanço microbiano intestinal de suínos é modificado após a ingestão de lactobacilos, em particular, com a diminuição da contagem de coliformes presentes nas fezes (CHANG et al, 2001).

Vassalo et al (1997) constataram diferenças significativas para o ganho de peso médio e incidência de diarreia para os leitões alimentados com rações contendo probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus toyoi*). A adição de probióticos nas rações para leitões na fase inicial de crescimento (10 aos 30 kg) proporcionou aumento significativo no peso e controle eficaz na incidência de diarreia.

Resultados obtidos por Ávila et al (1998) mostraram que a combinação de vacina (pili K88, K99, 987P E F42 de *Escherichia coli*) com o probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) por 28 dias foi o mais eficiente tratamento para o controle de diarreia causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Chang et al (2001) obtiveram bons resultados com o uso de *Lactobacillus reuteri* BSA 131 em suínos, como o melhoramento na conversão alimentar e ganho de peso. Sendo estes resultados encorajadores para o uso do probiótico em substituição de antibióticos usados rotineiramente como suplemento alimentar em suínos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Utilizou-se quatro diferentes cepas, sendo todas bactérias:

Escherichia coli hemolítica suína: procedente do Laboratório Marcos Enrietti, Curitiba-PR. Foi utilizada como cepa indicadora na verificação da atividade antimicrobiana.

Staphylococcus aureus coagulase positiva (ATCC 14458): procedente do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos-CEPPA). Foi utilizada como cepa indicadora na verificação da atividade antimicrobiana.

Lactobacillus reuteri LPB - P01-001: isolada do estômago de suíno, na Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia – UFPR. Foi verificada seu potencial como probiótico.

Lactobacillus sp LPB - P08-002: isolada do intestino grosso de suíno, na Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia – UFPR. Foi verificada seu potencial como probiótico

A cepa *Escherichia coli* hemolítica suína apresentava-se repicada em ágar sangue e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em ágar nutriente. Ambas as cepas foram ativadas em caldo triptona soja estéril e incubadas a 37 °C por 24 horas.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos necessários nas análises e produção do probiótico estão relacionados a seguir:

- autoclave vertical de laboratório (PHOENIX, MDL AV 75);
- balança analítica (SCIENTECH 120 x 0,0001);
- banho-maria (TECNAL, TE 184);
- bomba de vácuo (TECNAL, TE 058);
- câmara de fluxo laminar (TROX, MDL FLV);

- centrífuga (A 14, 30005784);
- centrífuga refrigerada (HITACHI, MDL CR 21E);
- cromatógrafo HPLC (SHIMADZU, LC 10 AD) e coluna HPX87H;
- espectrofotômetro (MILTON ROY, MDL 20 D);
- estufa bacteriológica (FANEM);
- evaporador rotativo (TECNAL, TE 210);
- fermentador (INCELTECH, LH.SGI, SET 2 M, MDL 7F);
- liofilizador (LABCONCO, MDL 224817 J);
- microscópio ótico binocular (LEITZ WETZLAR 590505);
- potenciômetro (HANNA, HI 9321);
- *shaker* (NOVA TÉCNICA, MDL NT 710);

3.3 DETERMINAÇÃO DO pH

Os valores de pH foram determinados por processo eletrométrico em potenciômetro, devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 (MACEDO, 1997).

3.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

3.4.1 Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), o qual se baseia na reação colorimétrica dos açúcares da amostra com o reativo cupro-alcálico, que na presença de reativo arsênio molibídico forma composto de coloração azul, cuja absorvância máxima ocorre em 535 nm. Para a curva padrão foi utilizada solução de glicose contendo 100 µg do açúcar/mL de solução.

3.4.2 Açúcares não Redutores (Sacarose)

Como os grupos redutores aldeído e cetona não se encontram livres na sacarose, efetua-se uma hidrólise ácida (BRASIL, 1981), tendo como resultado duas moléculas de açúcares redutores, uma de glicose e uma de frutose que foram determinadas pelo método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), com a coluna HPX87H, operado nas condições apresentadas na TABELA 4:

TABELA 4. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Cromatógrafo	Condições de operação
Temperatura da coluna	60 °C
Fase móvel-eluyente	H ₂ SO ₄
Concentração da fase móvel	5 mM
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min
Pressão da bomba	48 kg/cm ²
Volume injetado	50 µL
Diluição	1:5

Nestas condições os tempos de retenção de cada componente podem ser expressos como mostrado na TABELA 5.

TABELA 5 - TEMPOS DE RETENÇÃO DE ALGUNS PADRÕES, MONITORADOS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA, NAS CONDIÇÕES ACIMA

Componente	Tempo de retenção (min)
Glicose	9,38
Ácido láctico	12,74
Ácido acético	14,92
Etanol	21,76

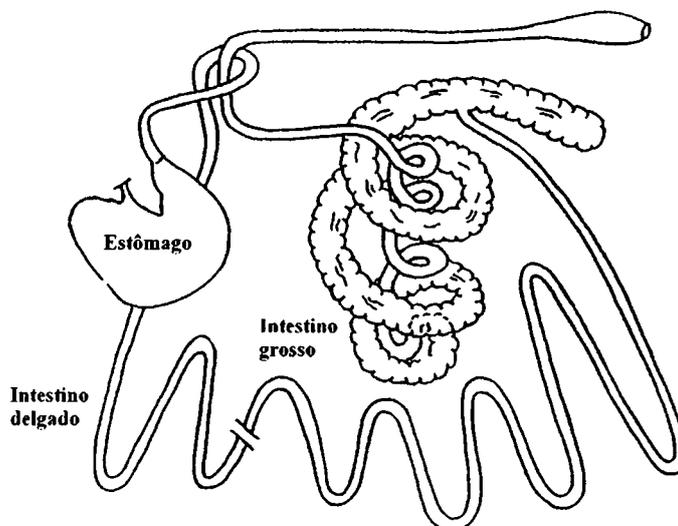
3.6 ISOLAMENTO DE *Lactobacillus*

Para o isolamento como espécie probiótica foi escolhido o gênero *Lactobacillus*, por ser considerado seguro (FULLER, 1992), capaz de competir por sítios de ligação (GILLILAND; WALKER, 1990) e apresentar especificidade ao hospedeiro, ou seja, isolada da mesma localização onde a atividade da espécie será exibida (FULLER, 1992).

3.7 ESCOLHA DE ANIMAL E ÓRGÃOS PARA ISOLAMENTO

O escolhido foi o suíno por ser um animal de importância econômica (SILVEIRA, 2005) e por ser susceptível a infecções gastrintestinais (LARPENT; CASTELLANOS; LARPENT, 1994). As amostras foram obtidas de animais jovens e adultos: não confinados, sem raça definida do tipo “caipira” (fazenda particular) e de animais confinados, raça Moura e Large White, do Centro de Estações Experimentais do Canguiri, pertencente ao Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os suínos apresentavam-se saudáveis e isentos de antibióticos; o material da flora microbiana foi coletado de animais abatidos em frigorífico e *in vivo*, provenientes do estômago, intestino delgado e grosso (FIGURA 15); pelo fato destes segmentos apresentarem maior proporção do gênero *Lactobacillus* (JONSSON; CONWAY, 1992).

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRATO GASTRINTESTINAL DE SUÍNO



FONTE: JONSSON; CONWAY (1992)

3.8 ISOLAMENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS PARA SUÍNO

Foi coletado conteúdo dos segmentos: estômago, intestino delgado e grosso, separadamente por *swab* estéreis e transportados em caldo MRS (MERCK) acrescido de 5% de bile (SIGMA), com a intenção de selecionar as cepas de melhor potencial probiótico em suíno (FULLER, 1992; GILLILAND; STAEY; BUSCH, 1984). Os microrganismos foram isolados, obtendo-se culturas puras, pela técnica da semeadura *pour plate* (plaqueamento em profundidade) em placas com meio ágar MRS de diluições sucessivas da amostra em água peptonada 0,1%, seguidas por incubação a 37 °C por 48 horas (REQUE, 1999), embora algumas espécies sejam aerotolerantes, o crescimento ótimo é alcançado sob condições microaerófilas ou anaeróbias (VARELA, 2005),

3.9 MANUTENÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

Para preservação em curto prazo as cepas após cultura em caldo foram repicadas em profundidade para tubos com ágar MRS, incubadas a 37 °C por 48 horas e estocadas a 4-7 °C.

Para manutenção em longo prazo e para uso como probiótico, procedeu-se a liofilização das culturas e, previamente obteve-se uma concentração ótima de biomassa em caldo MRS ou no meio alternativo. O meio fermentado foi centrifugado a 6000 rpm por 30 min, com o objetivo de obter um concentrado de células; o sobrenadante foi desprezado, a biomassa lavada e ressuspensa a 10% (p/v) em leite desnatado estéril, congelada e liofilizada (12 horas a 50 mmHg).

3.10 SELEÇÃO DE CEPAS PROBIÓTICAS

A seleção de cepas probióticas foi baseada na morfologia em microscópio óptico e coloração de Gram de *Lactobacillus*, na viabilidade durante a estocagem a temperatura de 4-7 °C, na sobrevivência durante o processo de liofilização e estocagem e pelas análises do rendimento, velocidade específica de crescimento e produtividade de biomassa nas diferentes condições de fermentações.

3.11 SOBREVIVÊNCIA DOS MICRORGANISMOS DURANTE A LIOFILIZAÇÃO E ESTOCAGEM

A sobrevivência foi verificada pelo número de células viáveis (item 3.12.2) em unidades formadoras de colônia/mL (ufc/mL) antes e após a liofilização. Diluições decimais foram feitas da suspensão do leite desnatado antes do congelamento, plaqueadas pelo método *pour plate* em ágar MRS e incubadas a 37 °C por 48 horas. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em água peptonada a 0,1%, diluídas, plaqueadas e incubadas. A sobrevivência das cepas liofilizadas foi de um mês de estocagem em temperatura ambiente, calculada em ufc/mL após um mês da

liofilização, dividida pela ufc/mL antes do congelamento (PALMFELDT; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

3.12 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

3.12.1 Peso Seco

A concentração de biomassa foi determinada gravimetricamente após filtração em membrana de 0,22 µm (MILLIPORE) e secagem a 80 °C por 24 horas até peso constante (NEYSENS et al, 2003).

3.12.2 Contagem de Células Viáveis

A contagem de células viáveis foi determinada pela semeadura *pour plate*, plaqueamento em profundidade. Selecionar diluições adequadas da amostra com água peptonada 0,1% e inocular um mL de cada diluição em placas de Petri separadas, estéreis e vazias. Em seguida verter nas placas, 15 a 20 mL de ágar MRS previamente fundido e resfriado a 45 °C. Misturar o inóculo com o meio de cultura, em movimentos circulares. Aguardar a completa solidificação do meio de cultura, inverter as placas e incubar em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas. Sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mL (ufc/mL) de amostra (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

3.13 ESTUDOS DE COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS

As caracterizações bioquímicas e fisiológicas de microrganismos foram baseadas nas seguintes análises: produção de catalase, identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, produção de gás a partir de glicose, crescimento a 15, 37 e 45 °C, comportamento em relação ao oxigênio livre, tolerância a diferentes valores de pH,

tolerância a substâncias inibitórias: 10% bile (SIGMA), 0,4% fenol, 4% e 8% NaCl, fermentação de diferentes fontes de carbono (API 50 CHL, BIOMÉRIEUX). Foi utilizado o Manual Bergey (KANDLER; WEISS, 1989) para interpretação dos resultados e identificação das diferentes espécies.

3.13.1 Prova da Catalase

Esta prova serve para comprovar a presença da enzima catalase em culturas de microrganismos. A verificação da atividade de catalase é importante na caracterização de certos grupos de bactérias.

A produção de catalase foi testada em caldo previamente reativado das cepas isoladas, após a transferência de algumas gotas do caldo fermentado em uma lâmina de vidro com 2 a 3 gotas de água oxigenada 10 vol., observa-se a presença de efervescência: positivo, se houver presença de bolhas de gás (desprendimento de O₂) e negativo na ausência de bolhas de gás (DAVIS, 1955; BIER, 1985).

3.13.2 Produção de Gás a partir de Glicose

Para observar a produção de gás a partir de glicose foi utilizado caldo MRS (glicose 20 g/L, proteose peptona 10 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L, polisorbato 80 1 mL/L, fosfato dipotássio 2 g/L, acetato sódio 5 g/L, citrato diamônio 2 g/L, sulfato magnésio 0,2 g/L e sulfato manganês 0,05 g/L), contendo tubos de Durhan (tubos invertidos para coleta do gás produzido pela fermentação) e determinada pela inoculação ao nível de 10% da cultura, previamente reativada em caldo MRS e incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas. Após este período foi observada a presença ou ausência de gás.

3.13.3 Tolerância a Extremos de Temperatura

A tolerância a extremos de temperatura foi determinada pela inoculação ao nível de 10% da cultura previamente reativada em caldo MRS e incubada a 15, 37 e 45 °C em estufa bacteriológica por 24 horas. Após este período as amostras foram previamente diluídas em água peptonada e plaqueadas em profundidade em ágar MRS. O resultado foi expresso em ufc/mL.

3.13.4 Comportamento em Relação ao Oxigênio Livre

Com o objetivo de verificar o comportamento das cepas em relação ao oxigênio e, conseqüentemente, visando uma maior obtenção de biomassa, foram realizadas duas fermentações uma estática e outra com agitação a 120 rpm. Para tal experimento, foi utilizado como inóculo cultura de 24 horas em caldo MRS, transferida ao nível de 10% (v/v) do meio a ser utilizado para caldo MRS, e incubada a 37 °C em estufa bacteriológica (condições estáticas) e em *shaker* a 120 rpm (agitação) por 24 horas. Após este período as amostras foram previamente diluídas em água peptonada e plaqueadas em profundidade em ágar MRS. O resultado foi expresso em ufc/mL.

3.13.5 Tolerância a Diferentes pH

A tolerância a diferentes pH: 2, 3, 4, 5, 6 e 8, em intervalo de duas em duas horas por quatro horas, foi determinada pela inoculação ao nível de 10% (v/v) da cultura previamente reativada ao caldo MRS ajustado a pH 2, 3, 4, 5, 6 e 8 usando HCl 4 N ou NaOH 3 N, e incubada a 37 °C em estufa bacteriológica. Após cada intervalo de duas horas eram determinadas às tolerâncias pela medida da densidade óptica a 580 nm (TOIT et al, 1998).

3.13.6 Tolerância a Substâncias Inibitórias

A tolerância a substâncias inibitórias: 10% bile (SIGMA), 0,4% fenol, 4% e 8% NaCl (DAVIS, 1955) em relação ao caldo MRS, foi determinada pela inoculação ao nível de 10% da cultura previamente reativada em caldo MRS e incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas. Após este período, as amostras foram previamente diluídas em água peptonada e plaqueadas em profundidade em ágar MRS. O resultado foi expresso em ufc/mL.

3.13.7 Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono

A identificação bioquímica das cepas escolhidas foi realizada através da fermentação de diferentes fontes de carbono da galeria API 50 CHL (BIOMÉRIEUX). Os resultados foram interpretados pelo programa estatístico APILAB PLUS, desenvolvido pelo laboratório BIOMÉRIEUX que permite obter uma identificação do microrganismo testado, determinando o gênero e a espécie da bactéria láctica analisada.

3.14 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA

3.14.1 Difusão em Poços

Os sobrenadantes de culturas, supostamente produtoras de substâncias antimicrobianas, são colocados em orifícios cortados em uma placa de ágar semeado com um organismo sensível (indicador). Durante a incubação, as substâncias antimicrobianas difundem-se pelo ágar, inibindo o crescimento do indicador e formando um halo ao redor do orifício (BIOCONSERVAÇÃO, 2005).

3.14.1.1 Cultivo da cepa isolada supostamente produtora de substâncias antimicrobianas

As cepas a serem investigadas foram inoculadas em caldo MRS ao nível de 10% (v/v) de uma cultura, previamente reativada e incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas.

3.14.1.2 Escolha e cultivo da cepa indicadora

A cepa indicadora usada foi a *Escherichia coli* hemolítica suína na qual foi cultivada em caldo triptona soja e incubada a 37 °C por 24 horas.

As espécies hemolíticas de *Escherichia coli* são achadas com alta frequência em suínos (McALLISTER; HAROLD; SHORT, 1979; KANDLER; WEISS, 1989). Elas quando aderem às vilosidades intestinais, desenvolvem problemas diarréicos que contribuem significativamente para o decréscimo do desempenho e da saúde de suínos (LARPENT; CASTELLANOS; LARPENT, 1994; SALDARRIAGA, CALLE, CAMACHO, 2000).

3.14.1.3 Concentração dos metabólitos presentes no meio de cultivo das cepas investigadas

O caldo MRS fermentado foi centrifugado a 6000 rpm por 30 min, o sobrenadante obtido foi concentrado em rotavapor, usando banho maria a 45 °C até 10% do volume inicial e o produto obtido (concentrado) foi esterilizado através de membrana filtrante 0,22 µm (ABDEL-BAR; HARRIS; RILL, 1987; PINTO; PONSANO; CASTRO-GOMEZ, 1996).

3.14.1.4 Determinação da capacidade inibitória dos concentrados e antibiótico

Para determinação da capacidade inibitória dos concentrados, uma alíquota do cultivo da cepa indicadora (*E. coli* hemolítica suína) foi semeada em superfície por meio de *swab* estéril em 15 mL de ágar Mueller Hinton. Em seguida, feito de forma asséptica orifícios de cinco milímetros de diâmetro no ágar, onde se adicionou uma alíquota de 10 µL do concentrado e as placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo diâmetro da zona clara ao redor do orifício e comparada com o antibiótico neomicina 30 µg (REDDY et al, 1983).

3.14.2 Determinação da Capacidade Inibitória do Sobrenadante da Fermentação do caldo MRS por *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em Mueller-Hinton

A determinação da capacidade inibitória do sobrenadante da fermentação do caldo MRS de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em Mueller-Hinton, foi realizada pela medida da densidade óptica a 620 nm em diferentes intervalos.

A cepa *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001, previamente reativada, foi transferida uma alíquota ao nível de 10% (v/v) para frasco contendo caldo MRS e incubada a 37° C por 24 horas. O caldo MRS fermentado foi centrifugado a 7 000 rpm a 15 min para remoção das células microbianas. O sobrenadante obtido foi adicionado a igual volume ao meio Mueller- Hinton (Difco) de dupla concentração e ajustado o pH a 5,5; 6,5 e 7, autoclavado e inoculado com microrganismos indicadores, *Escherichia coli* hemolítica suína (Gram negativo), *Staphylococcus aureus* (Gram positivo), a absorbância inicial de 0,020. Foi utilizado como controle o meio Mueller-Hinton ajustado a pH 5,5; 6,5 e 7.

3.14.3 Determinação da Capacidade Inibitória da Reuterina

A determinação da capacidade inibitória da reuterina foi realizada pela medida da densidade óptica a 620 nm em diferentes intervalos.

A cepa *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 foi previamente inoculada em caldo MRS e incubada por 24 horas a 37° C e, em seguida, transferida uma alíquota ao nível de 10% (v/v) para frasco contendo 400 mL de caldo MRS suplementado com 250 mM de glicerol e incubado a 37° C por 24 horas. O caldo MRS-glicerol fermentado foi centrifugado a 7 000 rpm por 15 min. O precipitado celular foi ressuscitado em 100 mL de uma solução de 250 mM de glicerol e incubado em anaerobiose a 37° C por 3 horas. As células da solução foram eliminadas mediante centrifugação, resultando num sobrenadante contendo reuterina, em equilíbrio nas formas monômero, monômero hidratado e dímero cíclico, proveniente do metabolismo anaeróbico do glicerol por *Lactobacillus reuteri* devido a enzima glicerol desidratase (OROBÓN, 2003).

O sobrenadante obtido foi adicionado a igual volume ao meio Mueller- Hinton (Difco) de dupla concentração de pH 5,5; 6,5 e 7 e inoculado com microrganismos indicadores, *Escherichi coli* hemolítica suína e *Staphylococcus aureus*, a absorbância inicial de 0,020 nm. Foi utilizado como controle o meio Mueller-Hinton de dupla concentração acrescido a igual volume com solução de glicerol a 250 mM e ajustado a pH 5,5; 6,5 e 7 e um segundo controle o meio Mueller-Hinton a pH 5,5.

3.15 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação do isolado bacteriano foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA, em Campinas – SP.

3.15.1 Extração do DNA e Amplificação do rDNA 16S

O DNA total genômico foi isolado de culturas puras usando o método da lise da proteinase K de acordo com Young e Blakesley (1991). As seqüências parciais DNA ribossomal 16S (gene para RNA ribossomal 16S) foram amplificadas por PCR do DNA genômico usando *primers* oligonucleotídeos p27f (LANE, 1991) e p1401r (HEUER et al, 1997), homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16S de bactérias. O PCR foi feito em reações de 50 µL, contendo 50-100 ng de DNA genômico, 5 µL de tampão 10X PCR (suplementado com enzima), 0,2 mmol L⁻¹ de uma mistura de dNTP, 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,4 µmol L⁻¹ de cada *primer* e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação do PCR foi realizada usando uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 3 min a 72 °C; e uma extensão final de 72 °C por 5 min, em equipamento BioRad (Thermal Cycler).

3.15.2 Seqüenciamento do PCR amplificado rDNA 16S

Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram a seguir purificados em coluna (*GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit*, Amersham Biosciences). O DNA purificado foi eluído em 30 µL de água esterilizada ultra pura (Milli Q). As amostras foram submetidas diretamente ao seqüenciamento em sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram p10f, p1100r (LANE et al, 1985), p765f (WEISBURG et al, 1991) e p782r (CHUN, 1995).

3.15.3 Análise filogenética

As seqüências parciais de rDNA 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados do RDP (*Ribosomal Database Project*, Wisconsin, USA; CME, 2005; MAIDAK *et al.*, 2001) e *Genbank* (NCBI, 2005b). Foram então selecionadas seqüências de organismos relacionados à seqüência do organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), segundo o software de análise disponível no RDP.

3.16 COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM MEIO MRS

Com o intuito de verificar o crescimento e o comportamento fermentativo no meio MRS (MERCK), foram realizadas fermentações com cada uma das cepas escolhidas.

3.16.1 Preparo do Inóculo para a Fermentação

O preparo do inóculo iniciou-se com a reativação das cepas mantidas em ágar sob refrigeração. As cepas foram transferidas em caldo MRS e incubadas a 37 °C por 48 horas.

3.16.2 Fermentação do Substrato

Foi inoculado em caldo MRS 1% (v/v) do inóculo das cepas escolhidas em relação ao volume total. A fermentação foi realizada nas mesmas condições de temperatura do inóculo e com duração de 12 horas.

3.16.3 Avaliação do Fermentado

Durante a fermentação foram realizadas amostragens em intervalos de duas horas para verificar a evolução do pH, consumo de açúcar, contagens de células viáveis e quantificação de ácidos orgânicos, cujas determinações seguiram metodologias descritas nos itens 3.3, 3.4, 3.12.2 e 3.5.

3.17 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO

Para produzir o probiótico em larga escala optou-se substituir o meio MRS (MERCK) por um meio alternativo de baixo custo.

3.17.1 Composição do Meio Alternativo

Utilizou-se como fonte de carbono o açúcar mascavo, por ser abundante e de baixo custo; como fonte de nitrogênio foi usado extrato de levedura (MACHADO, 2001; COVENTRY et al, 1996) para suprir as necessidades nutricionais do microrganismo.

O meio alternativo baseou-se nas formulações de Coventry et al (1996), foi utilizado diferentes concentrações de extrato de levedura (0; 0,5; 1; 2; 4 e 6% w/v) e açúcar mascavo (0; 0,25; 1; 3; 4; 5; 6 e 9%, w/v). Foram testadas num total de 24 formulações descritas no QUADRO 6.

QUADRO 6 – FORMULAÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCAVO

Formulação	% extrato de levedura	% açúcar mascavo
1	0	4
2	0	5
3	0	6
4	0	9
5	0,5	4
6	0,5	5
7	0,5	6
8	0,5	9
9	1	4
10	1	5
11	1	6
12	1	9
13	2	0
14	2	0,25
15	2	1
16	2	3
17	4	0
18	4	0,25
19	4	1
20	4	3
21	6	0
22	6	0,25
23	6	1
24	6	3
Controle	MRS (MERCK)	

3.17.2 Preparo do Meio Alternativo

Após pesagem dos componentes, o açúcar mascavo foi diluído em água destilada e filtrado para retirada de possíveis resíduos; em seguida adicionou-se extrato de levedura; o meio foi ajustado a pH 6,5 (por adição de NaOH 1 N ou HCl 4 N) e autoclavado a 121 °C por 15 min.

3.17.3 Preparo do Inóculo e Fermentação

O meio foi inoculado com cultura de 24 horas em caldo MRS a 10% em relação ao meio alternativo, e incubado a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas. O crescimento celular foi medido por densidade óptica a 610 nm e o resultado expresso como a leitura obtida em absorbância em meio alternativo pela leitura obtida em absorbância em caldo MRS, com a seguinte interpretação:

- a) leitura em meio alternativo/leitura obtida em caldo MRS ($ABS/ABS\ MRS$) = 1, não houve diferença no crescimento celular nos dois meios inoculados;
- b) leitura em meio alternativo/leitura obtida em caldo MRS ($ABS/ABS\ MRS$) < 1, diminuiu o crescimento no meio alternativo;
- c) leitura em meio alternativo/leitura obtida em caldo MRS ($ABS/ABS\ MRS$) > 1, aumentou o crescimento no meio alternativo.

3.17.4 Delineamento experimental e análise estatística da otimização do meio alternativo

Os valores de absorbância em meio alternativo pela absorbância em meio MRS ($ABS/ABS\ MRS$) das diferentes composições foram submetidos à análise de variância por meio de polinômios ortogonais. O modelo da análise de variância utilizado foi o inteiramente casualizado com distribuição fatorial hierárquica. A decomposição total dos graus de liberdade, para o efeito de fonte de carbono (C) versus fonte de nitrogênio (N), foi realizada via análise de regressão linear, quadrática e cúbica (STEEL;

TORRIE, 1980). As pressuposições de homogeneidade e normalidade da variância residual foram verificadas pelos testes de Cochran e Shapiro-Wilks, respectivamente. A análise e interpretação dos resultados estatísticos se deu através dos p-valores do teste F de Snedecor. As análises foram feitas usando o sistema SAS – *Statistical Analysis System*, versão 8.2, através dos procedimentos para Modelo Linear Geral (GLM) e Regressão.

3.18 ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO ALTERNATIVO

Com o objetivo de caracterizar um sistema de produção de células viáveis das cepas escolhidas para adição em probióticos, estudos da cinética de crescimento dos microrganismos foram efetuados.

3.18.1 Preparo do Inóculo para a Fermentação

O preparo do inóculo iniciou-se com a reativação das cepas mantidas em ágar sob refrigeração. As cepas foram transferidas em caldo MRS e incubadas a 37 °C por 48 horas.

3.18.2 Fermentação do Substrato

Foi inoculado em duas diferentes composições do meio de cultivo (formulação 9: 1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo; formulação 16: 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo (QUADRO 5)10% (v/v) do inóculo das cepas escolhidas em relação ao volume total. As fermentações foram realizadas nas mesmas condições de temperatura do inóculo com variação de 12 a 28 horas.

As fermentações foram realizadas em fermentador com capacidade de 2 litros (FIGURA 16), nas seguintes condições: pH constante de 6,5 e sem controle; para manter o pH foi adicionado, automaticamente, hidróxido de sódio (120g/L) 3N;

agitação de 80 rpm, apenas para evitar que as células sedimentem no fundo do biorreator e incorporar o mínimo possível de partículas de ar, devido as exigências fisiológicas das cepas em estudo.

FIGURA 16 – FERMENTADOR COM CAPACIDADE DE 2 LITROS



3.18.3 Avaliação do Fermentado

Durante as fermentações foram realizadas amostragens para verificar a evolução do pH, consumo de açúcar, concentração de biomassa e quantificação de ácidos orgânicos, cujas determinações seguiram metodologias descritas nos itens 3.3, 3.4, 3.12.1 e 3.5.

3.18.4 Análises da Evolução da Biomassa em Função do Tempo de Fermentação

- a) cálculo da velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}): traça-se o gráfico do logaritmo neperiano da concentração celular em g/L (LnX) vs. tempo (horas) para diferentes limites iniciais e finais de tempo, determinando-se, através

do melhor coeficiente de correlação, o início e a duração da fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular da melhor correlação fornecerá o valor de μ (velocidade específica de crescimento) (BONOMI; SCHMIDELL, 2001);

- b) o rendimento em biomassa formada em relação ao substrato consumido ($Y_{X/S}$) é obtido correlacionando Δx produzido com o ΔSx consumido (substrato consumido para produzir X, obtido descontando do total de substrato consumido);

$$Y_{X/S} (\text{g.g}^{-1}) = (X_f - X_i) / (S_i - S_f)$$

Onde: X_f = biomassa final; X_i = biomassa inicial; S_i = açúcar inicial; S_f = açúcar final

- c) a produtividade em biomassa (P_X), definida por:

$$P_X (\text{g/L.h}) = \mu \cdot X$$

Onde: μ = velocidade específica de crescimento; X = biomassa final

- d) o rendimento em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado pela fórmula (HISS, 2001):

$$Y_{P/S} (\text{g.g}^{-1}) = (P_f - P_i) / (S_i - S_f)$$

Onde: P_f = produto final (ácido láctico + ácido acético); P_i = produto inicial; S_i = açúcar inicial; S_f = açúcar final

3.19 PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO FORMULAÇÕES EM MEIO BÁSICO BALANCEADO

Durante o desenvolvimento do processo produtivo foi verificada a possibilidade da obtenção de iguais desempenhos obtidos no meio formulado com extrato de levedura - produto mais oneroso na formulação - em meios isento desse material, ou com a adição de quantidades mínimas, tendo em vista o custo envolvido.

Na tentativa de substituir o extrato de levedura por uma fonte de nitrogênio menos onerosa fez-se a estimativa do meio básico balanceado. A composição do meio básico levou em conta a composição elementar do microrganismo a ser cultivado e sua

capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultivo em massa celular (SCHMIDELL, 2001).

As formulações descritas abaixo foram inoculadas com culturas de 24 horas em caldo MRS a 10% em relação ao meio, e incubadas a 37° C em estufa bacteriológica por 24 horas. O crescimento celular foi medido em peso seco e o resultado foi expresso em g/L:

- 1: 0% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia (meio básico balanceado);
- 2: 0,5% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
- 3: 1% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
- 4: 2% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
- 5: 4% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia.

3.20 ESTUDO DO CRESCIMENTO CELULAR DO MEIO ALTERNATIVO COM ADIÇÃO DE URÉIA E FÓSFORO

3.20.1 Adição de Uréia

Realizou-se um estudo cinético com 2% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia, com a intenção de verificar a produtividade de biomassa.

3.20.2 Adição de Fósforo

As formulações com adição de fontes de fósforo: fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) nas concentrações de: 0,1, 0,5 e 1%, descritas em seqüência, foram inoculadas com cultura de 24 horas em caldo MRS a 10% em relação ao meio e incubadas a 37° C em estufa bacteriológica por 24 horas. O crescimento celular foi medido em peso seco e o resultado foi expresso em g/L:

- 1: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 ;
- 2: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0,1% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 ;
- 3: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0,5% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 ;
- 4: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 1% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 ;
- 5: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0,1% de K_2HPO_4 ;
- 6: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0,5% de K_2HPO_4 ;
- 7: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 1% de K_2HPO_4 ;

3.21 AVALIAÇÃO DA CEPA *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 COM POTENCIAL PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO DE LEITÕES DESMAMADOS NA FASE DE CRECHE

Para avaliar a atividade probiótica *in vivo* da cepa isolada *Lactobacillus reuteri* foi realizado um experimento em campo, utilizando leitões desmamados.

3.21.1 Local

O estudo foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Campus de Jaboticabal (SP).

3.21.2 Animais e Instalações

Foram utilizados 36 leitões desmamados aos 23 dias de idade, com peso médio inicial de 6,72 kg, raça Three corss, e alojados em um galpão com 12 baias suspensas de alvenaria de 1,50 x 2,00 m com o terço final de piso ripado. Todos os leitões receberam ração e água à vontade e iguais condições de manejo, assim como o vermífugo ivermectina (Ouro Fino Saúde Animal) a 1% no início do experimento.

3.21.3 Variáveis Estudadas

Foram avaliados os índices zootécnicos referentes a ganho de peso diário (GPD), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) na fase 1 (23 a 35 dias de idade), fase 2 (35 a 54 dias de idade), fase 3 (54 a 72 dias de idade) e no período total (23 a 72 dias de idade). A conversão alimentar é definida como a quantidade de ração consumida em relação ao ganho de peso, ou seja, quantidade de ração consumida para produzir um kilo de peso vivo.

3.21.4 Tratamentos

Foram utilizados três tratamentos (TABELA 6).

TABELA 6 – TRATAMENTOS COM DIETA BASAL, DIETA BASAL COM ANTIBIÓTICO E DIETA BASAL COM PROBIÓTICO

Tratamentos	Descrição
T1	Dieta basal
T2	Dieta basal + antibiótico sulfato de neomicina (Ouro Fino) 56 ppm
T3	Dieta basal + probiótico a 1% (<i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001 – 10^7 ufc/g)

3.21.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados (DBC) com três repetições de quatro animais cada (dois machos e duas fêmeas). Os dados foram analisados através do procedimento Modelo Linear Geral (GLM) do programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS®- 1998), e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

3.21.6 Alimentação

Foram utilizadas rações para as fases: pré-inicial, que corresponde a fase 1 (23 a 35 dias de idade); inicial, fase 2 (35 a 54 dias de idade) e fase 3 (54 a 72 dias de idade), cuja composição e análise calculada dos componentes é demonstrada na TABELA 7. A ração para a fase pré-inicial foi formulada com ingredientes de alta digestibilidade e com poucos fatores anti-nutricionais.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO ALIMENTAR E ANÁLISE CALCULADA DOS COMPONENTES DAS RAÇÕES PARA LEITÕES DESMAMADOS

Composição alimentar		
Ingredientes	Pré-inicial (kg)	Inicial (kg)
Milho	48,336	57,49
Farelo de soja	26,105	30,61
Produto lácteo	20,00	3,00
Açúcar	-	2,00
Fosfato bicálcico	2,178	0,267
Calcáreo	0,468	0,781
Inerte	2,00	1,50
Óleo de soja	-	1,00
Antioxidante	0,010	-
Metionina	0,312	0,100
Lisina	0,236	0,077
Treonina	0,068	0,045
Cloreto de Sódio	0,156	-
Suplemento mineral/vitaminico ¹	0,100	-
Suplemento Mineral/vitaminico ²	-	3,13
Total	100,00	
Composição calculada		
Proteína bruta (%)	21,00	19,00
Energia digestível (kcal/kg)	3411,0	3336,0
Lactose (%)	8,00	1,200
Cálcio (%)	0,900	0,840
Fósforo disponível (%)	0,500	0,440
Sódio (%)	0,220	0,180
Metionina (%)	0,629	0,396
Metionina + cistina (%)	0,810	0,650
Lisina (%)	1,360	1,200
Treonina (%)	0,910	0,790
Triptofano (%)	0,279	0,250

FONTE: ROSTAGNO et al (2005);

NOTA: ¹Suplemento mineral e vitaminico sem promotor de crescimento. Níveis de garantia por kg de ração: vitamina A – 4.000 UI; D₃ – 220 UI; E – 22 mg; K – 0,5 mg; B₂ – 3,75 mg; B₁₂ – 20 µg; pantotênico de cálcio – 12 mg; niacina – 20 mg; colina – 60 mg; Iodo – 140 µg; selênio – 300 µg; manganês – 10 mg; zinco – 100 mg; cobre – 10 mg; ferro – 99 mg. ²Núcleo para suínos fase inicial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ISOLAMENTO DE CEPAS COM POTENCIAL PARA USO COMO PROBIÓTICOS PARA SUÍNOS

No isolamento foram obtidas 33 cepas bile resistentes (5% de bile) de suíno.

Normalmente o gênero *Lactobacillus* é caracterizado por microrganismos que necessitam de um complexo nutricional normalmente encontrados quando o meio contém carboidratos fermentescíveis, peptona, extrato de carne e levedura. Suplementação com suco de tomate, manganês, acetato e ésteres de ácidos oléicos, especialmente Tween 80, são estimulantes ou até mesmo essenciais para muitas espécies. Geralmente os lactobacilos são cultivados em meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) e Betabacterium (KANDLER; WEISS, 1989; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

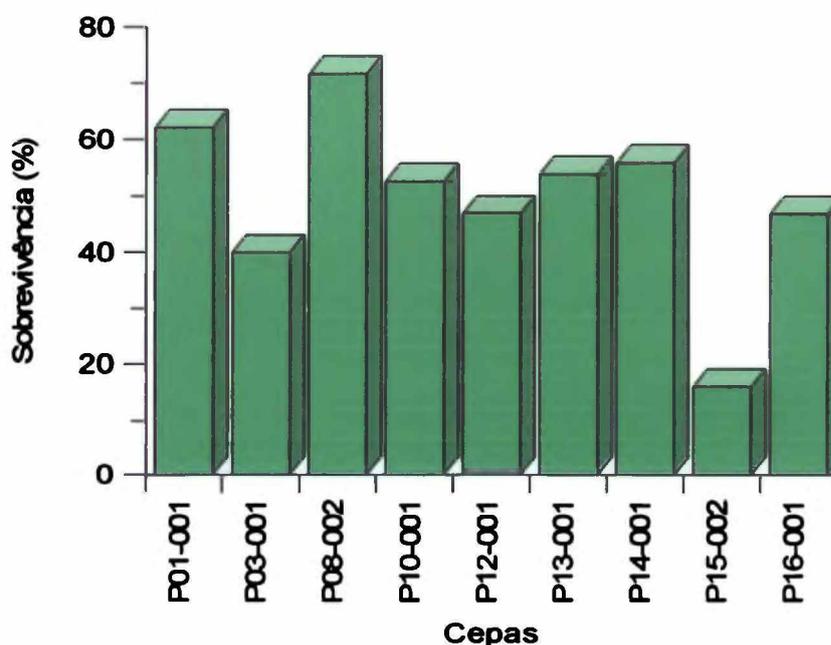
Considera-se que a concentração de bile deva ser de 0,3% (p/v) para ser usada como seleção de espécies probióticas para humano (GILLILAND; STAEY; BUSH, 1984; PENNACCHIA et al, 2004). Como a média diária do fluxo biliar é muito alta em suíno, ao redor de dois litros para cada 40 kg de suíno (GILLILAND; WALKER, 1990; FULLER, 1992), em relação ao adulto humano (70 kg) que produz 400 a 800 mL de bile diária (SECRETION, 2005), foi utilizado uma concentração superior de bile recomendada para seleção de cepas para humano, para que o microrganismo isolado apresentasse tolerância a altas concentrações de bile e possa crescer no trato intestinal do suíno. Patel et al (2004) isolaram do intestino humano espécie de *Lactobacillus reuteri* altamente resistente a 2% de bile e Gilliland (1979) comprovou que lactobacilos isolados de intestino animal, como *L. fermentum*, foram mais tolerantes a sais biliares que espécies isoladas de produtos lácteos.

4.2 SELEÇÃO DE CEPAS PROBIÓTICAS

Na seleção foram obtidas nove cepas de acordo com a morfologia bacilar, coloração de Gram positiva (KANDLER; WEISS, 1989) e viabilidade das culturas mantidas em ágar MRS durante a estocagem de refrigeração (4-7° C): cepa P01-001 de origem do estômago de suíno confinado da UFPR; P03-001, de origem do intestino grosso de suíno confinado da UFPR; P08-002, de origem do intestino grosso de leitão não confinado de fazenda particular; P10-001, de origem do intestino grosso de suíno não confinado de fazenda particular; P12-001, de origem do intestino delgado de suíno confinado da UFPR; P13-001, de origem do intestino delgado de suíno confinado da UFPR; P14-001, de origem do intestino grosso de suíno confinado da UFPR; P15-002 de origem do intestino grosso de suíno não confinado de fazenda particular e P16-001 de origem do intestino grosso de suíno não confinado de fazenda particular.

Estas nove cepas foram liofilizadas e verificadas a sobrevivência após um mês de estocagem a temperatura ambiente (FIGURA 17).

FIGURA 17. SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS ISOLADAS LIOFILIZADAS APÓS UM MÊS DE ESTOCAGEM EM TEMPERATURA AMBIENTE



Das nove, apenas duas foram escolhidas, em razão da melhor sobrevivência, P01-001, com 62,21% de sobrevivência (de origem do estômago de suíno confinado da UFPR) e P08-002, com 71,80% de sobrevivência (de origem do intestino grosso de leitão não confinado de fazenda particular). As mesmas cepas liofilizadas e mantidas em temperatura de refrigeração (4-7°C) durante o período de um mês apresentaram altas porcentagens de sobrevivência - entre 93 a 100% - sendo esta temperatura de estocagem, após liofilização, recomendada por Kandler e Weiss (1989). Para obter uma alta sobrevivência das células bacterianas em temperatura ambiente, faz-se necessário investigar outros métodos de conservação celular.

O processo de liofilização pode resultar em danos fisiológicos e estruturais das células bacterianas elevando em perda substancial da viabilidade. Fuller (1992) cita que, em geral, os lactobacilos são insensíveis ao congelamento e estocagem a -20° C ou abaixo, mas são menos resistentes a liofilização e, especialmente, em secagem por pulverizador (*spray-drying*). Valdez e Diekmann (1993) sugerem o uso de farinha de centeio com glutamato monossódico como crioprotetores para o preparo de culturas iniciais, pela importância econômica: curto tempo de secagem e alta sobrevivência na liofilização depois de estocagem a temperatura ambiente. Pesquisadores observaram que mudanças fisiológicas (aquecimento, baixo pH e choque osmótico) geralmente aumentam a habilidade do organismo em resistir às condições ambientais adversas (PRASAD; McJARROW, GOPAL, 2003). Dziezak (1988) e Fuller (1992) sugerem o encapsulamento de microrganismos como forma de preservação a longo prazo.

Barreto et al (2003) comentam que para elevar a taxa de sobrevivência dos microrganismos em produtos probióticos são necessárias inovações tecnológicas como a seleção de cepas mais resistentes, a pré-adaptação das cepas às condições de estresse, a adição de micronutrientes e agentes redutores e a microencapsulação.

4.3 ESTUDOS DO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DAS CEPAS ESCOLHIDAS

4.3.1. Prova da Catalase

A prova da catalase resultou negativa – ausência de efervescência - para as cepas P01-001 e P08-002. O gênero *Lactobacillus* não possui catalase, enzima que tem a propriedade de decompor o peróxido de hidrogênio (KANDLER; WEISS, 1989).

4.3.2 Identificação de Ácidos Orgânicos e Presença de Gás Produzidos pela Fermentação da Glicose

As cepas P01-001 e P08-002 são denominadas bactérias ácido lácticas por produzirem ácido láctico, e heterofermentativas por produzirem também gás (CO₂) e outras substâncias (FIGURAS 18 e 19) a partir de glicose (KANDLER; WEISS, 1989; TARANTO; VALDEZ; PEREZ-MARTINEZ, 1999).

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DE P01-001 EM CALDO MRS

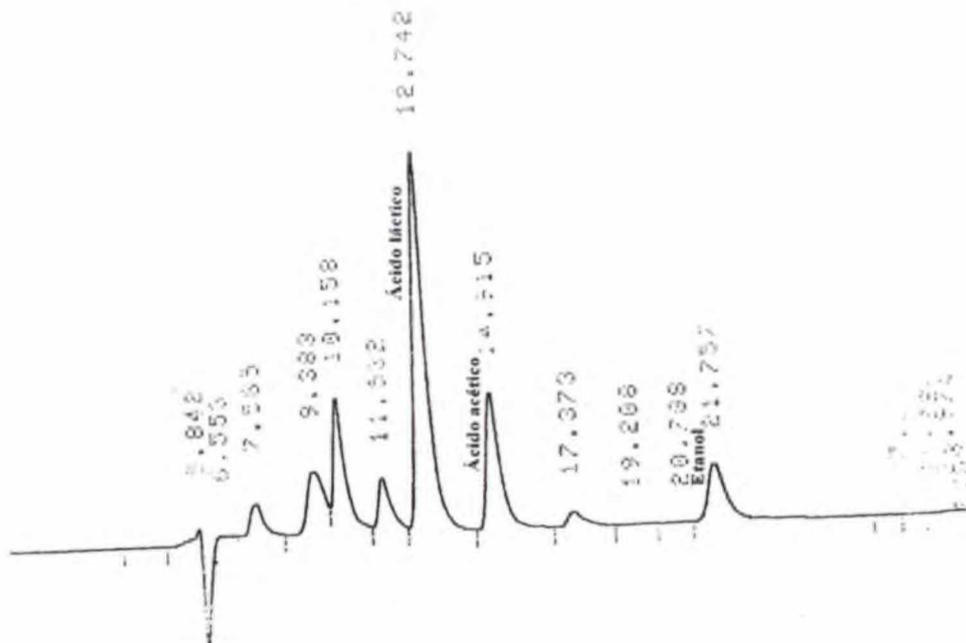
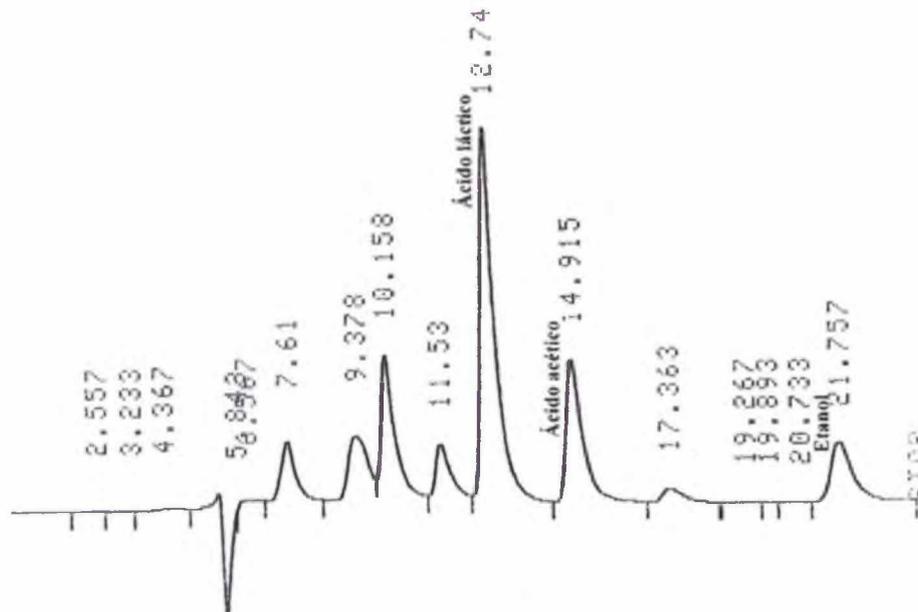


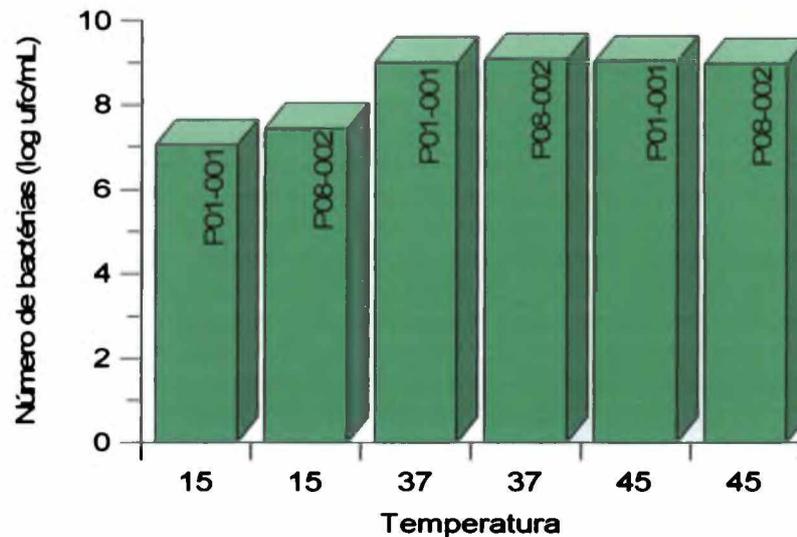
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DE P08-002 EM CALDO MRS



4.3.3 Tolerância a Extremos de Temperatura

As cepas P01-001 e P08-002 apresentam melhor crescimento na temperatura de 37 e 45 °C e pouco crescimento em 15 °C (FIGURA 20). Os lactobacilos crescem em temperatura de 2-53 °C, cuja temperatura ótima geralmente está entre 30-40 °C (KANDLER; WEISS, 1989; CHERUBIN, 2003). Segundo o Manual Bergey (BUCHANAN; GIBBONS, 1974) a espécie heterofermentativa que cresce a temperatura de 45 °C e não apresenta crescimento a 15 °C é a *Lactobacillus fermentum*.

FIGURA 20 - COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM 24 HORAS DAS CEPAS P01-001 E P08-002 A TEMPERATURAS DE 15, 37 E 45 °C

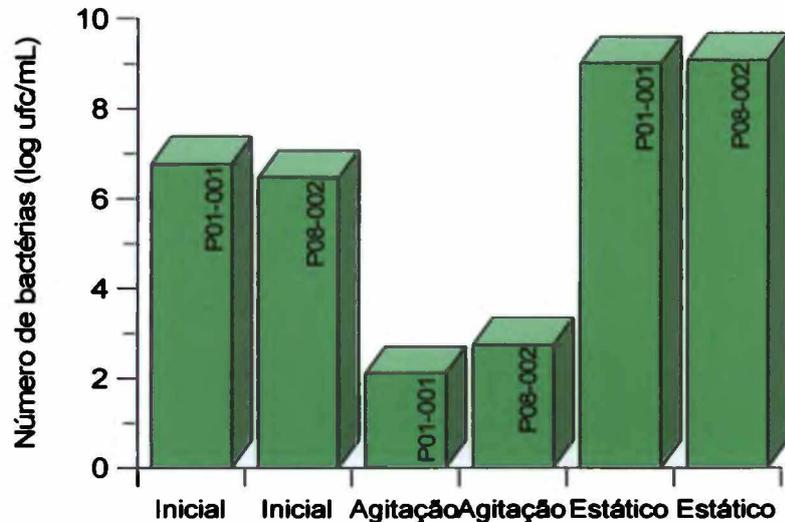


4.3.4 Comportamento em Relação ao Oxigênio Livre

Quanto ao comportamento em presença do oxigênio livre, as cepas P01-001 e P08-002 (FIGURA 21) necessitam de redução do teor de oxigênio para um melhor desenvolvimento, provavelmente em razão da sensibilidade de suas enzimas à condições fortemente oxidativas (BIER, 1985).

Verificada morte celular de ambas as cepas nas condições com agitação (*shaker* a 120 rpm), o inóculo inicial de 10^7 ufc/mL passou a $10^2 - 10^3$ ufc/mL após 24 horas de incubação, provavelmente pelo fato de serem microaerófilas.

FIGURA 21 - COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM 24 HORAS DAS CEPAS P01-001 E P08-002 EM AGITAÇÃO E ESTÁTICO



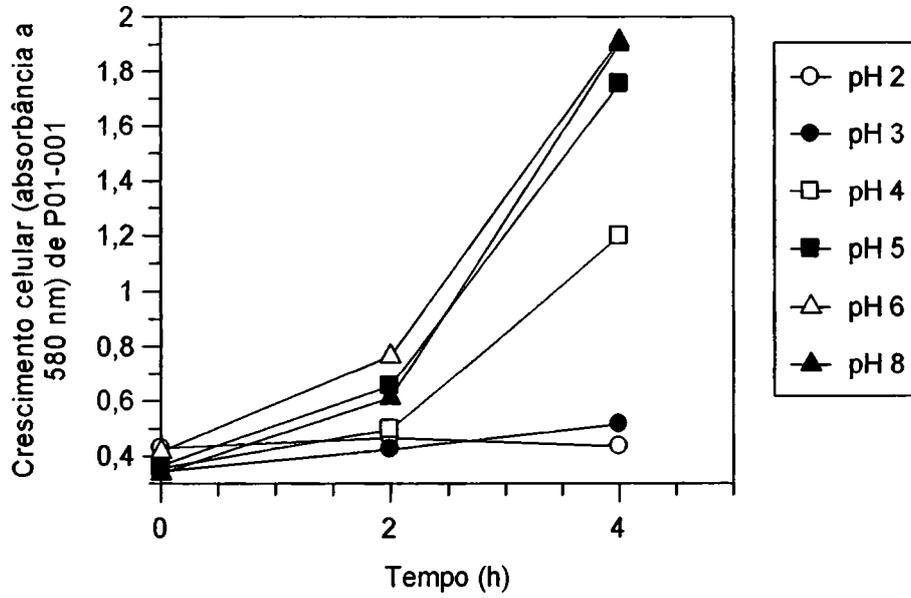
4.3.5 Tolerância a Diferentes pH

As cepas P01-001 e P08-002 apresentam crescimento a pH 4, 5, 6 e 8, verificado por absorbância a 580 nm (FIGURA 22), e sobrevivem a pH 2 e 3 no período de 4 horas, verificado através da presença de colônias pelo método *pour plate*. O pH do HCl excretado no estômago é de 0,9, mas a presença de alimento faz com que o pH aumente ao valor de 3,0. Após a ingestão do alimento, o estômago leva de 2 a 4 horas para esvaziar (PENNACCHIA et al, 2004), portanto as cepas isoladas P01-001 e P08-002, pelo teste *in vitro*, sobreviveriam ao período da digestão e ao pH correspondente do estômago, sendo a tolerância a pH baixo uma importante característica probiótica, juntamente com a resistência à bile e fenol, para a sobrevivência e crescimento das bactérias no trato gastrointestinal (GILLILAND; WALKER, 1990; McDONALD; FLEMING; HASSAN, 1990; GONZALO et al, 1998; CHERUBIN, 2003).

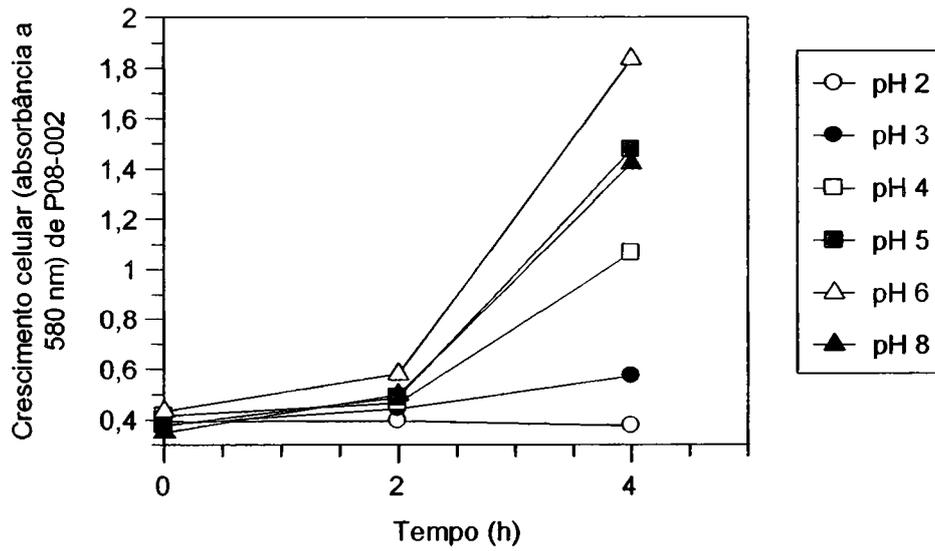
Alguns autores observaram que espécies de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram alta tolerância a pH 3 (XANTHOPOULOS; LITOUPOULOU-TZANETAKI; TZANETAKIS, 2000).

FIGURA 22 - CINÉTICA DAS CEPAS P01-001 (A) E P08-002 (B) EM DIFERENTES pH DO MEIO MRS

(A)



(B)



4.3.6 Tolerância a Substâncias Inibitórias

As FIGURAS 23 e 24 apresentam valores em Log (ufc/mL) das cepas P1-001 e P8-002 respectivamente em relação as substâncias inibitórias: 10% de bile, 0,4% de fenol e 4-8% de NaCl. Observa-se que tanto a cepa P01-001 e P08-002 apresentam melhores tolerâncias a 10% de bile, 0,4% de fenol e 4% de NaCl, mas não a 8% de NaCl, comparado com o controle (MRS), com características de *Lactobacillus fermentum* segundo Davis (1955).

A tolerância à bile e ao fenol (os fenóis podem ser formados no intestino por bactérias que desaminam alguns aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou produzido por proteínas endógenas) são características importantes para melhor habilidade de sobrevivência, não necessariamente de multiplicação, no intestino.

Alguns autores sugerem que a concentração de 0,4% de fenol causa ação bacteriostática para alguns microrganismos (XANTHOPOULOS; LITOPOULOU-TZANETAKI; TZANETAKIS, 2000).

Xanthopoulos, Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis (2000) isolaram de fezes de crianças a cepa *Lactobacillus reuteri* DC423 com alta resistência (0,4%) a fenol: a contagem de células viáveis manteve-se completamente não afetada pelo fenol.

FIGURA 23 - TESTE DE TOLERÂNCIA FRENTE A DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS: MRS (CONTROLE), BILE (B), FENOL (F) E NaCl DA CEPA P01-001

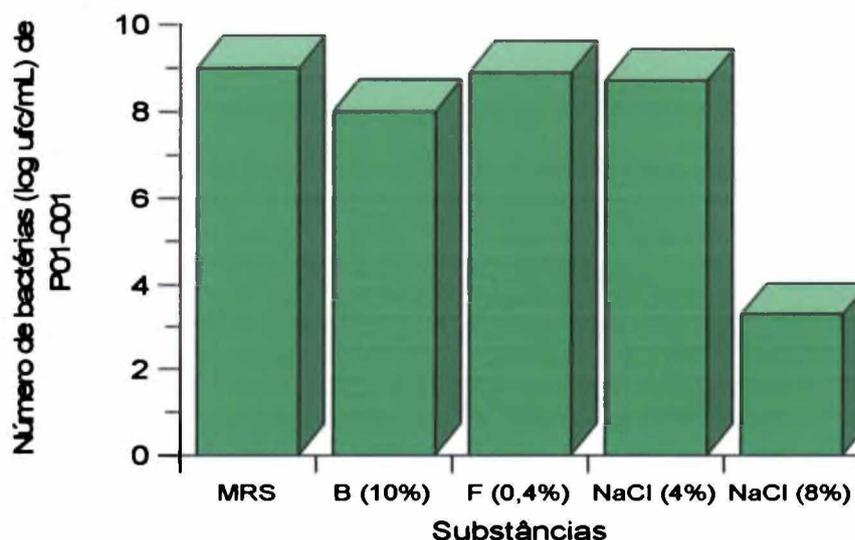
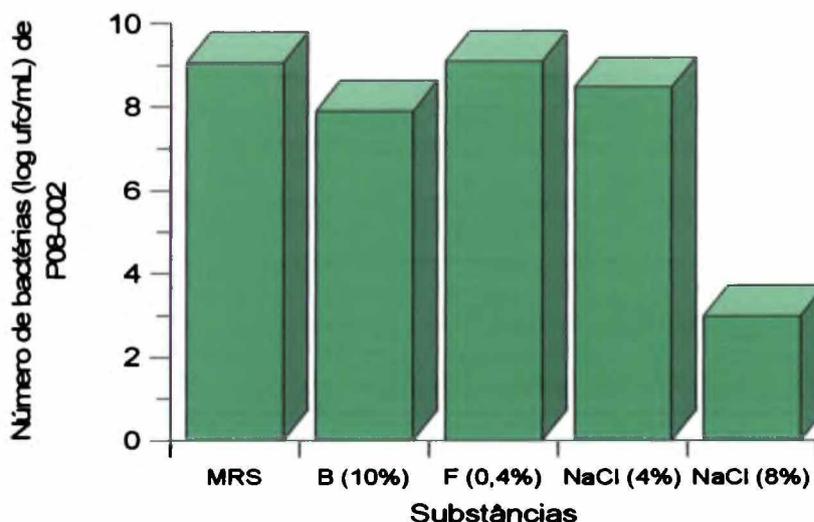


FIGURA 24 - TESTE DE TOLERÂNCIA FRENTE A DETERMINADAS SUBSTÂNCIAS: MRS (CONTROLE), BILE (B), FENOL (F) E NaCl DA CEPA P08-002



4.3.7 Fermentação de Diferentes Fontes de Carbono

De acordo com a fermentação de carboidratos selecionados da galeria API 50 CH (BIOMÉRIEUX) (FIGURA 25), ou seja, através do catabolismo destes açúcares, resulta a produção de ácidos orgânicos, verificados pela troca da cor púrpura de bromocresol a cor amarela. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da cepa e servem também para sua identificação ou tipagem. Foram identificadas as cepas P01-001 e P08-002 como *Lactobacillus fermentum* e, de acordo com o Manual Bergey, a espécie *Lactobacillus fermentum* não pode ser diferenciada da espécie de *L. reuteri* por simples testes fisiológicos, é necessário outro teste para separar as duas espécies, podendo ser: determinação da % mol G+C (guanina+citosina), ácido diamino da peptideoglicana ou mobilidade eletroforética de ácido láctico desidrogenase (LDH)(KANDLER; WEISS, 1989).

FIGURA 25 - RESULTADOS OBTIDOS (TROCA DA COR PÚRPURA DE BROMOCRESOL A COR AMARELA) DA FERMENTAÇÃO DE 49 AÇÚCARES DA GALERIA API 50CH

(A) CEPA P01-001



(B) CEPA P08-002



4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Atividade Antimicrobiana em Poços

A atividade antimicrobiana das cepas isoladas - P01-001 e P08-002 - e do antibiótico - sulfato de neomicina 30 μg - frente à cepa *Escherichia coli* hemolítica suína foram semelhantes, observada pela formação do halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* hemolítica suína ao redor de cada orifício contendo o sobrenadante concentrado da fermentação do caldo MRS de ambas as cepas e do disco de antibiótico (FIGURA 26).

FIGURA 26 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS METABÓLITOS PRESENTES EM MEIO DE CULTIVO DAS CEPAS ISOLADAS E EFEITO DE ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* HEMOLÍTICA SUÍNA



NOTA: A) disco de antibiótico sulfato de neomicina 30 μg ;
B) sobrenadante da fermentação da cepa P01-001 em MRS concentrado a 10%;
C) sobrenadante da fermentação da cepa P08-002 em MRS concentrado a 10%.

A atividade antimicrobiana das cepas P01-001 e P08-002 podem ser devidas à produção de compostos como as bacteriocinas (TAGG; DAJANI; WANNA MAKER, 1976) e ácidos orgânicos, que teriam ação antibacteriana especialmente em relação às

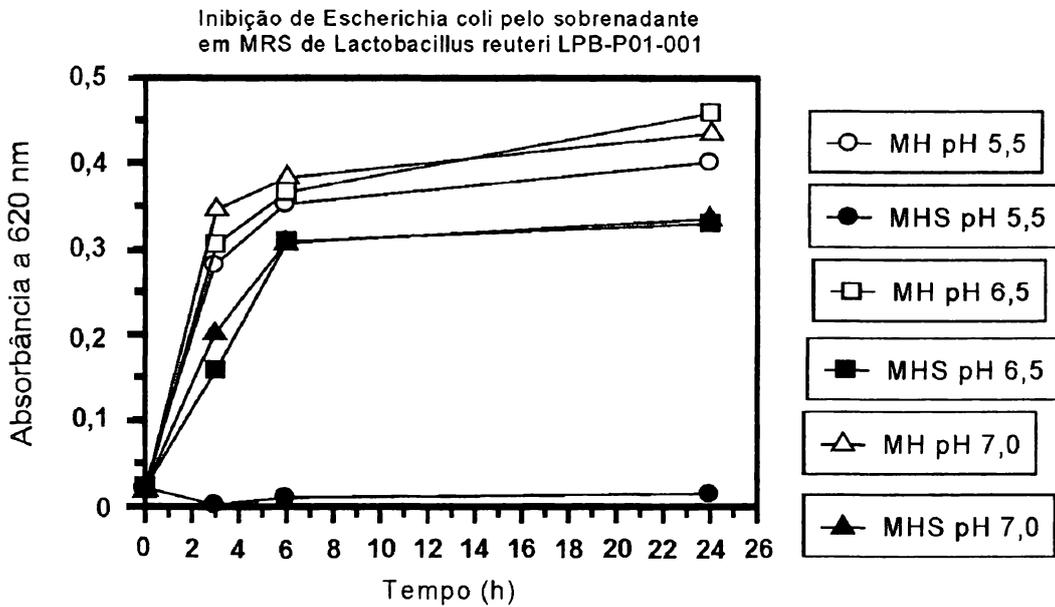
bactérias patogênicas segundo Fuller (1992) e Pinto, Ponsano e Castro-Gomez (1996). No entanto, *E. coli*, uma bactéria Gram negativa, é mais sensível à presença de ácidos.

Foi investigada a resistência de crescimento das cepas P01-001 e P08-002 em relação à neomicina - antibiótico utilizado como promotor de crescimento em suínos - em ambos os estudos não apresentava-se halo de inibição; portanto, ambas as cepas são resistentes a este tipo de antibiótico.

4.4.2 Determinação da Capacidade Inibitória do Sobrenadante da Fermentação do Caldo MRS por *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em Meio Mueller-Hinton

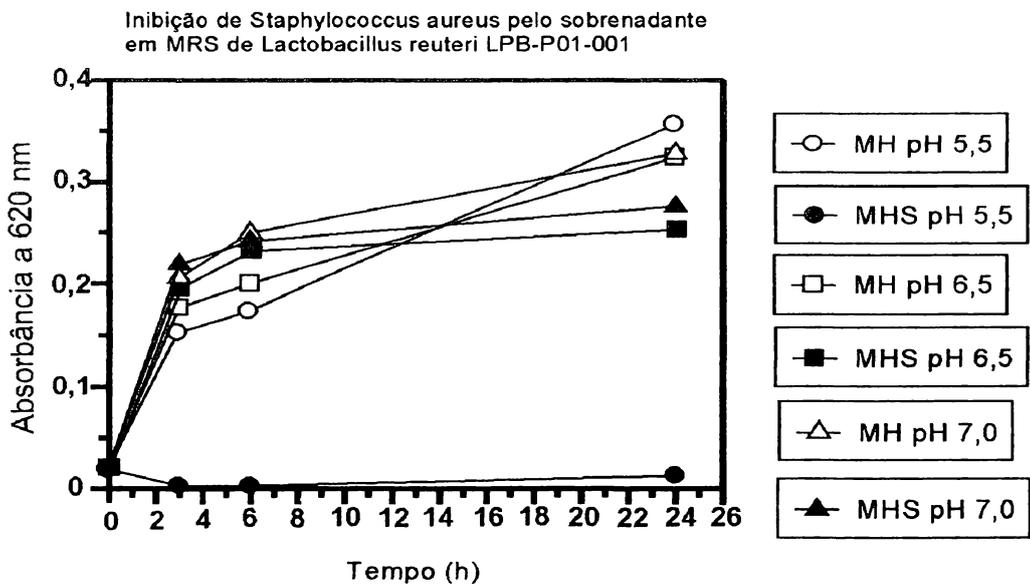
As porcentagens de inibição de crescimento de *Escherichia coli* hemolítica suína e *Staphylococcus aureus* (FIGURAS 27 e 28) pelo sobrenadante da fermentação do caldo MRS por *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001, em meio Mueller-Hinton ajustado a diferentes pH, a 24 horas foi de 96,7% a pH 5,5; 28,9% a pH 6,5 e 22,5% a pH 7,0 para *Escherichia coli* hemolítica suína, e de 96,1% a pH 5,5; 21,9% a pH 6,5 e 15,9% a pH 7,0 para *Staphylococcus aureus*. A inibição do crescimento de ambos indicadores foi maior em pH 5,5, provavelmente, devido à presença de compostos antimicrobianos como ácidos láctico, acético, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas (LÜCK, 1981; BEUCHAT; GOLDEN, 1989; SAEED, et al, 2005), porém os ácidos orgânicos inibem melhor entre o pH 3 e 5.

FIGURA 27 - INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* hemolítica suína PELO SOBRENADANTE-MRS DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON



NOTA: MH: meio Muller Hinton; MHS: meio Mueller Hinton acrescido de sobrenadante da fermentação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001

FIGURA 28 - INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* PELO SOBRENADANTE-MRS DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON



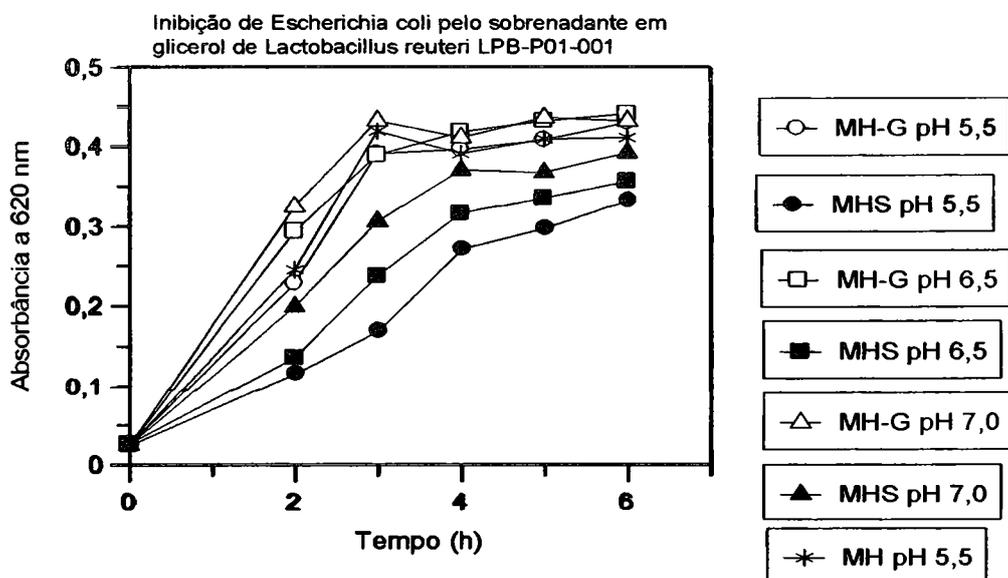
NOTA: MH: meio Muller Hinton; MHS: meio Mueller Hinton acrescido de sobrenadante da fermentação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001

4.4.3 Determinação da Capacidade Inibitória da Reuterina

A porcentagem de inibição de crescimento de *Escherichia coli* hemolítica suína e *Staphylococcus aureus* (FIGURAS 29 e 30) em meio Mueller-Hinton acrescido do sobrenadante, proveniente da fermentação do glicerol por *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001, e ajustado a diferentes pH a 6 horas de incubação, foi de 22,7% a pH 5,5; 19,7% a pH 6,5 e 9,2% a pH 7,0 para *Escherichia coli* hemolítica suína, e de 32,1% a pH 5,5; 23,0% a pH 6,5 e 16,8% a pH 7,0 para *Staphylococcus aureus*.

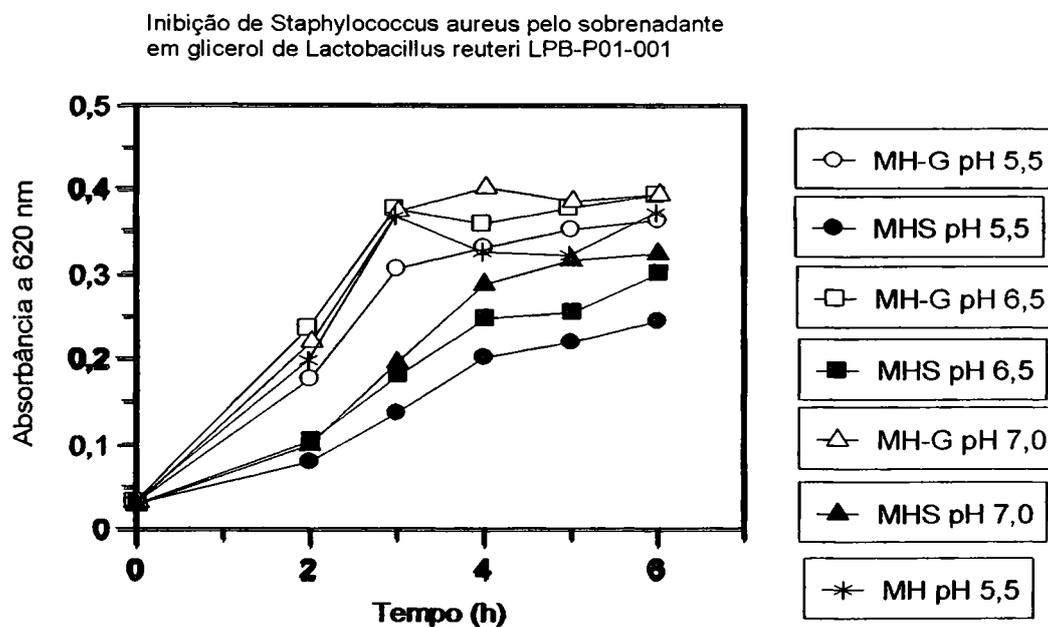
A inibição do crescimento de ambos indicadores - causadores de diarreia - foi menor em comparação ao sobrenadante da fermentação do caldo MRS devido, provavelmente, ao acúmulo de poucas substâncias inibidoras como no primeiro caso. A fermentação do glicerol pelo *Lactobacillus reuteri* produz reuterina, substância neutra, não protéica, efetiva a um amplo intervalo de pH (de 2 a 8), mostrando-se mais estável e efetiva a pH ácido contra as culturas empregadas (OROBÓN, 2003).

FIGURA 29 - INIBIÇÃO DE *Escherichia coli* hemolítica suína PELO SOBRENADANTE DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON



NOTA: MH-G: meio Muller Hinton acrescido de glicerol; MHS: meio Mueller Hinton acrescido de sobrenadante-glicerol da fermentação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001; MH: meio Muller Hinton

FIGURA 30 - INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* PELO SOBRENADANTE DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MUELLER-HINTON



NOTA: MH-G: meio Muller Hinton acrescido de glicerol; MHS: meio Mueller Hinton acrescido de sobrenadante-glicerol da fermentação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001; MH: meio Muller Hinton

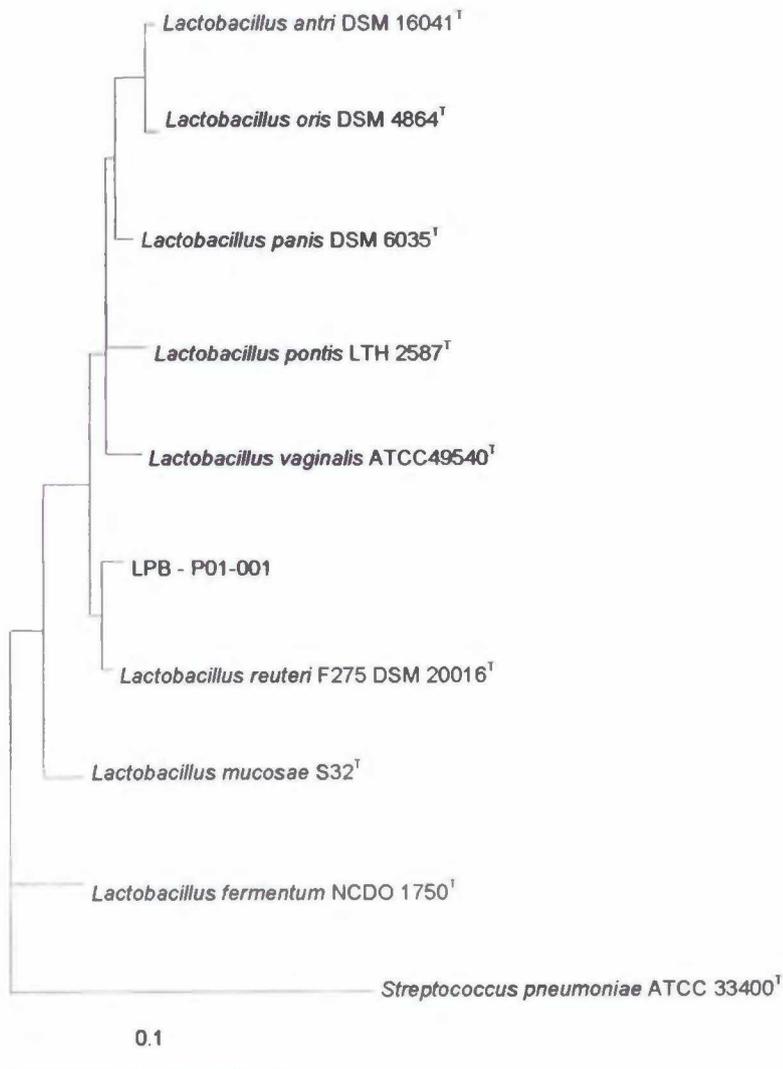
4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular foi através da análise da seqüência de rDNA 16S obtida da amostra LPB-P01-001 (cepa que apresentou maiores valores para os parâmetros cinéticos item 4.9) e é apresentada na FIGURA 31. Esta seqüência foi analisada usando a rotina BLAST do *Genbank* e *Sequence Match* do RDP, cujos resultados são apresentados na FIGURA 32 e ANEXO 2.

FIGURA 31 - SEQUÊNCIA PARCIAL DE rDNA 16S DA AMOSTRA LPB - P01-001

>LPB-P01-001
CACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGA
GCGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAG
CCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTCTGGGATGG
ACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGCGCATG
ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGGAGACAG
GTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTG
ACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG
CAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAG
TGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGCG
GCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTATACGATGAGTGCTAGGTGT
TGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTTACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGAGTACGACCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGTGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGTGTTAATTGACAGCTACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTCCCTTC
GGGACGCACTGACAGGTGGTGCATGGTCGTGTCAGCTCGTGTGCGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG

FIGURA 32 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DEMONSTRANDO A RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE A AMOSTRA LPB - P01-001 E LINHAGENS DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM BASE EM SEQUÊNCIAS DE rDNA 16S.



Os resultados de identificação são apresentados a seguir:

Amostra	Identificação
LPB - P01-001	<i>Lactobacillus reuteri</i> - Kandler et al. 1982

A seqüência parcial do rDNA 16S da amostra LPB - P01-001 apresentou 98% de similaridade, com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Lactobacillus reuteri*, disponíveis nas bases de dados. Apresentou ainda porcentagens de similaridade mais baixas, 96 a 97%, com outras espécies de *Lactobacillus*, tais como, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis* e *Lactobacillus antri*.

A análise filogenética (ANEXO 1) confirmou uma proximidade filogenética maior da amostra LPB- P01-001 com a espécie *Lactobacillus reuteri*.

4.6 CARACTERÍSTICAS DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001

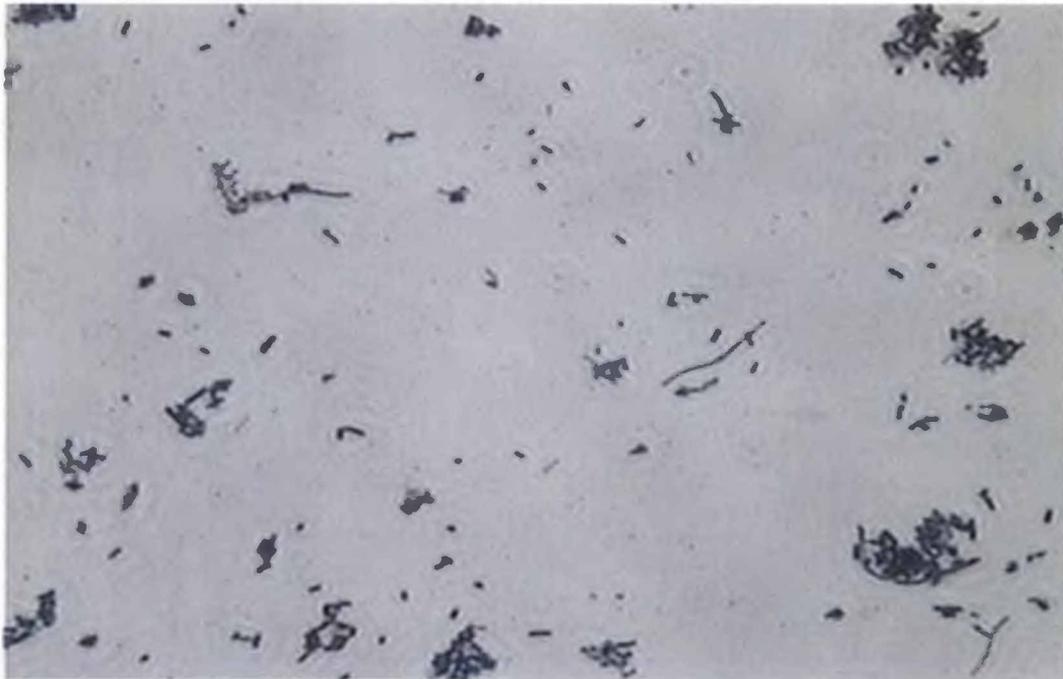
A FIGURA 33 mostra colônias típicas de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001: brilhantes, lisas, convexas, de bordos regulares e não pigmentadas.

FIGURA 33 - COLÔNIAS DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001, EM ÁGAR MRS, PELO MÉTODO *POUR PLATE*



A FIGURA 34 mostra a morfologia da bactéria *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 sendo um bacilo curto, ligeiramente irregular, com terminação arredondada, geralmente 0,7-1,0 por 2,0-5,0 μm , apresenta-se sozinho, em pares e pequenos grupos.

FIGURA 34 - MORFOLOGIA DE *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 EM MICROSCÓPIO ÓPTICO

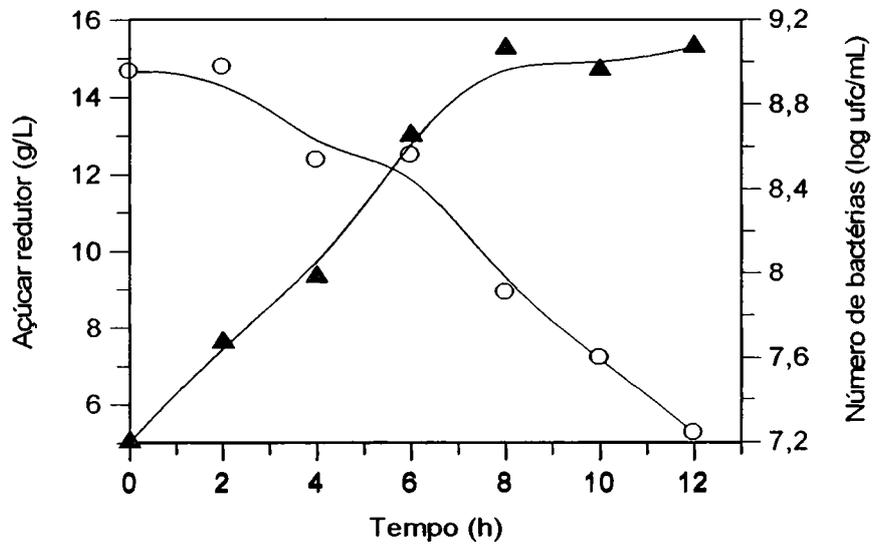


4.7 COMPORTAMENTO FERMENTATIVO EM MEIO MRS

O comportamento fermentativo das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 em meio usado como referência, MRS, é observado nas FIGURAS 35 e 36, onde o tempo ótimo para atingir o final da fase exponencial de crescimento ou o início da estacionária de produção de biomassa, é a partir de oito horas de fermentação para ambas as cepas (*Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002).

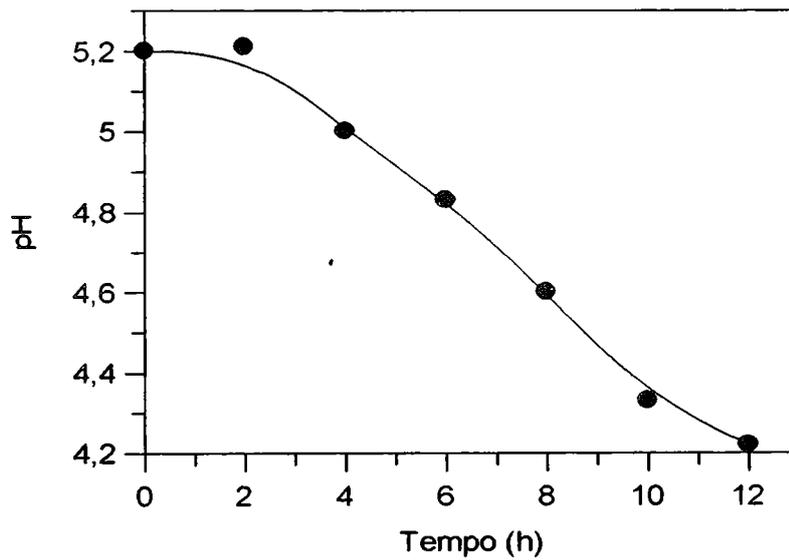
FIGURA 35 – CINÉTICA DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM CALDO MRS: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



NOTA: ○ açúcar redutor (g/L) e ▲ número de bactérias (log ufc/mL)

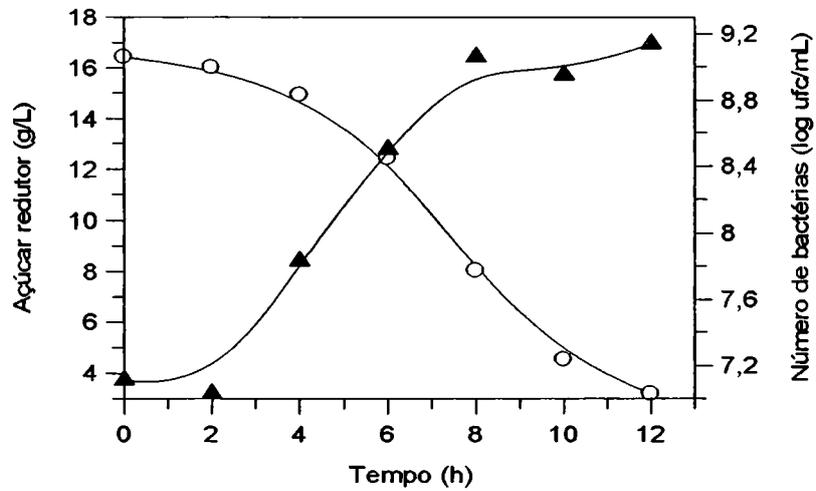
(B)



NOTA: ● pH

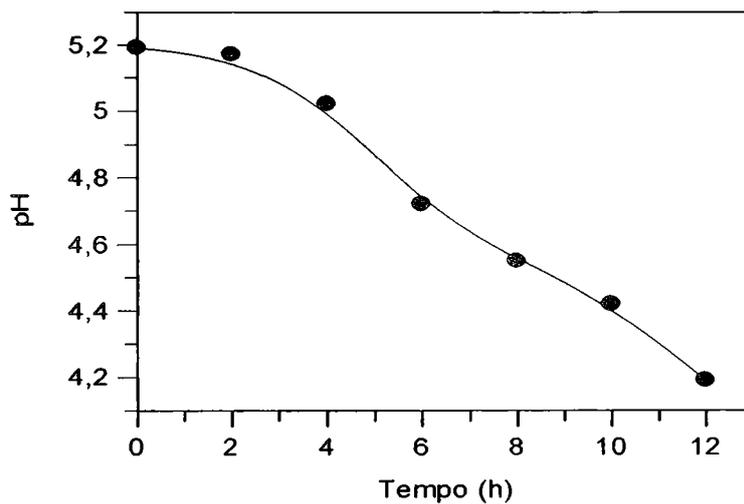
FIGURA 36 - CINÉTICA DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 EM CALDO MRS: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



NOTA: ○ açúcar redutor (g/L) e ▲ número de bactérias (log ufc/mL)

(B)

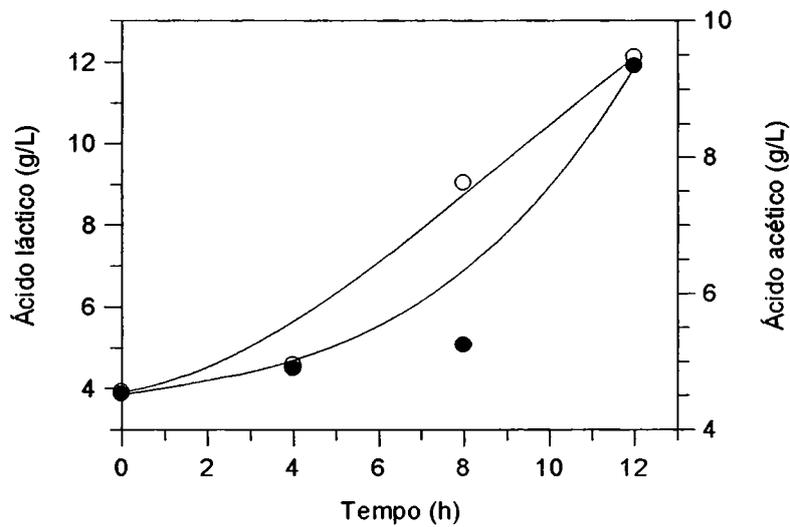


NOTA: ● pH

4.7.1 Produção de Ácidos Orgânicos em Caldo MRS

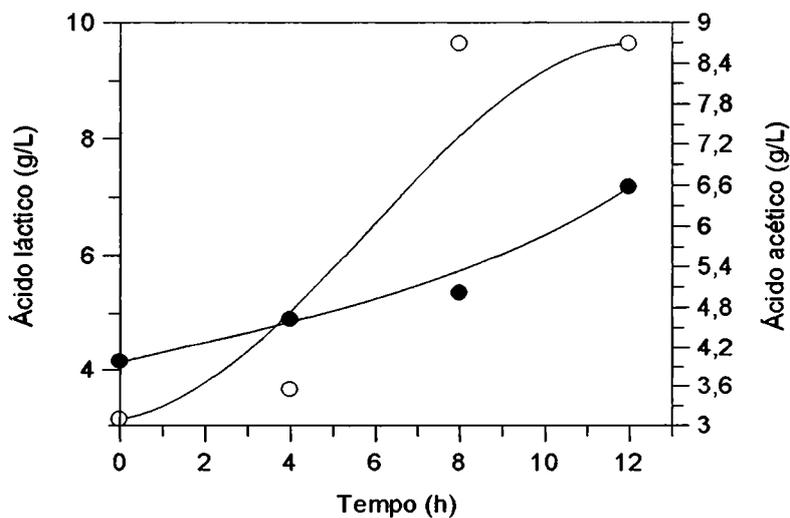
Através das análises dos cromatogramas, pode-se observar a produção de ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), durante a fermentação no meio MRS das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 (FIGURAS 37 e 38), confirmando que são cepas heterofermentativas.

FIGURA 37 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MRS



NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

FIGURA 38 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 EM MEIO MRS

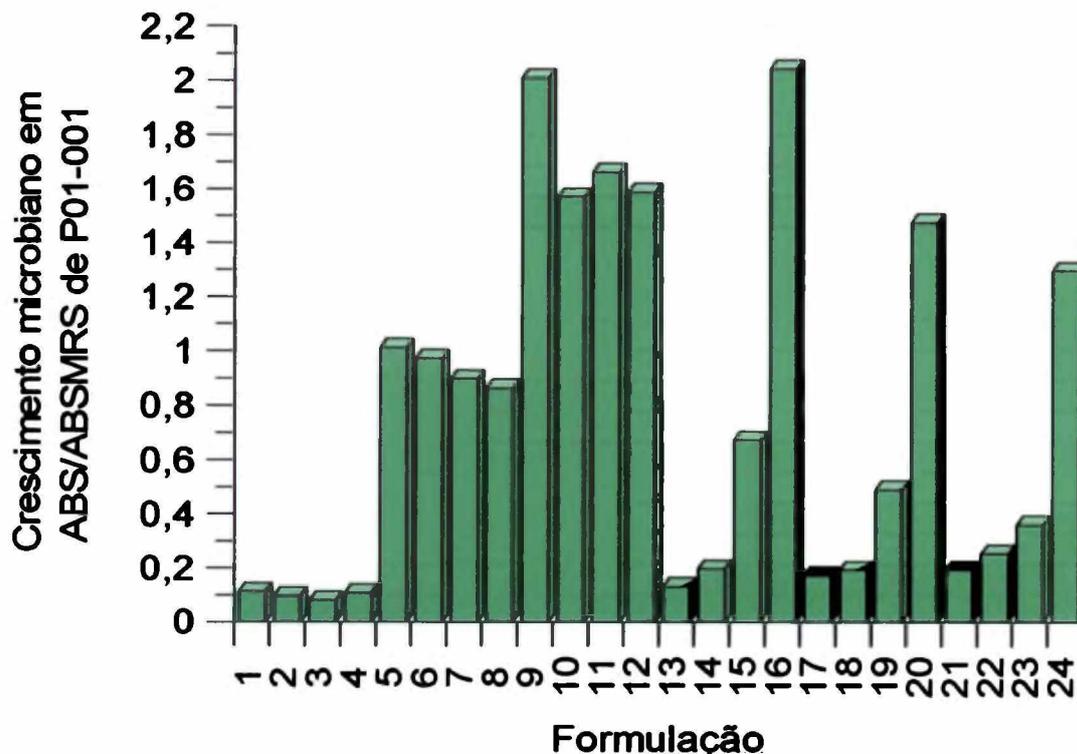


NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

4.8 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO

Na tentativa de produzir biomassa em grande escala (SCHMIDELL, 2001) foram formulados meios alternativos menos onerosos que o meio comercial MRS para os processos fermentativos, usando como fonte de carbono um derivado da cana-de-açúcar - açúcar mascavo - de baixo custo e em disponibilidade, e como fonte de nitrogênio o extrato de levedura. Foram num total de 24 formulações com diferentes concentrações de extrato de levedura e açúcar mascavo. Os crescimentos microbianos das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 foram expressos em absorbância, sendo estes relacionados com a absorbância obtida no meio MRS (MERCK) (FIGURAS 39 e 40).

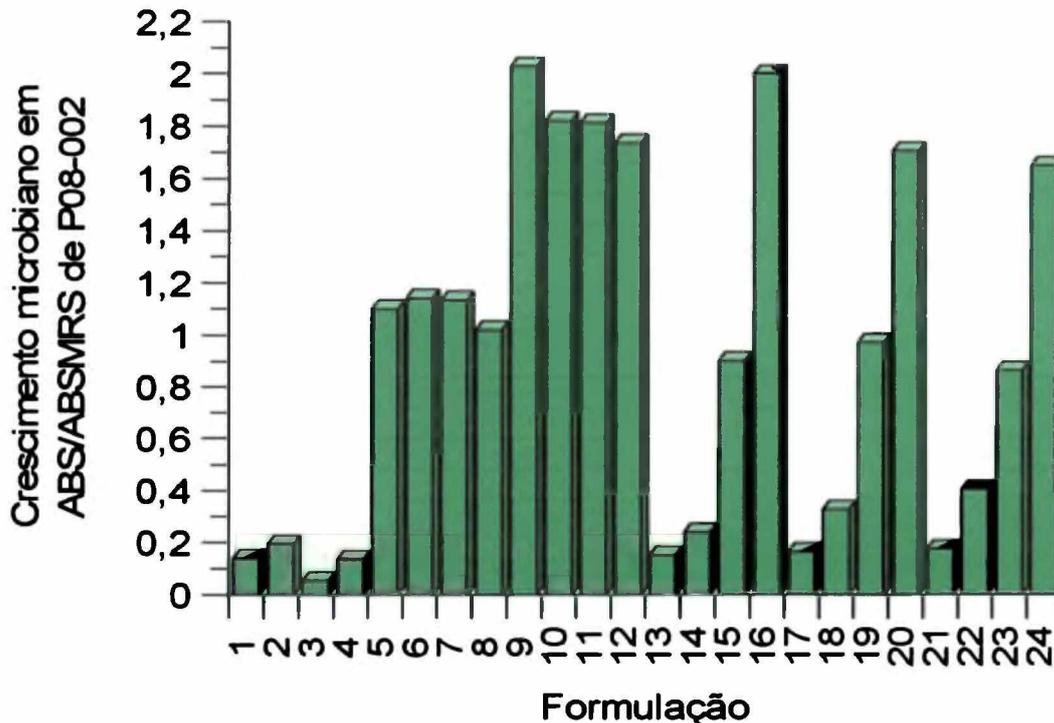
FIGURA 39 – CRESCIMENTO MICROBIANO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO ALTERNATIVO



NOTA: Formulações: 1) 0%N e 4%C; 2) 0%N e 5%C; 3) 0%N e 6%C; 4) 0%N e 9%C; 5) 0,5%N e 4%C; 6) 0,5%N e 5%C; 7) 0,5%N e 6%C; 8) 0,5%N e 9%C; 9) 1%N e 4%C; 10) 1%N e 5%C; 11) 1%N e 6%C; 12) 1%N e 9%C; 13) 2%N e 0%C; 14) 2%N e 0,25%C; 15) 2%N e 1%C; 16) 2%N e 3%C; 17) 4%N e 0%C; 18) 4%N e 0,25%C; 19) 4%N e 1%C; 20) 4%N e 3%C; 21) 6%N e 0%C; 22) 6%N e 0,25%C; 23) 6%N e 1%C; 24) 6%N e 3%C;

Onde: N = extrato de levedura e C = açúcar mascavo.

FIGURA 40 – CRESCIMENTO MICROBIANO DE *Lactobacillus sp.* LPB-P08-002 NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO ALTERNATIVO



NOTA: Formulações: 1) 0%N e 4%C; 2) 0%N e 5%C; 3) 0%N e 6%C; 4) 0%N e 9%C; 5) 0,5%N e 4%C; 6) 0,5%N e 5%C; 7) 0,5%N e 6%C; 8) 0,5%N e 9%C; 9) 1%N e 4%C; 10) 1%N e 5%C; 11) 1%N e 6%C; 12) 1%N e 9%C; 13) 2%N e 0%C; 14) 2%N e 0,25%C; 15) 2%N e 1%C; 16) 2%N e 3%C; 17) 4%N e 0%C; 18) 4%N e 0,25%C; 19) 4%N e 1%C; 20) 4%N e 3%C; 21) 6%N e 0%C; 22) 6%N e 0,25%C; 23) 6%N e 1%C; 24) 6%N e 3%C; Onde: N = extrato de levedura e C = açúcar mascavo.

Os crescimentos microbianos das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 não foram alterados nas formulações com 4, 5, 6 e 9% de açúcar mascavo, entretanto, houve aumento com o acréscimo de extrato de levedura, respondendo melhor a partir de 1% de extrato de levedura. Concentrações baixas de açúcar mascavo (0, 0,25 e 1%), não apresentam bom crescimento, tendo melhores respostas a partir de 3%. Níveis altos de extrato de levedura (superior a 4%) não resultam em aumento celular. As melhores respostas em crescimento celular para as cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 foram as formulações 9 (1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo) e 16 (2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo), indicando que os microrganismos testados necessitam de uma quantidade equilibrada dos dois componentes.

4.8.1 Delineamento Experimental e Análise Estatística da Otimização do Meio Alternativo

O experimento com as várias formulações do meio alternativo foi submetido à análise estatística, através da análise do delineamento experimental (ANEXO 3), e foram obtidas as equações de regressão e gráficos de superfície de respostas (FIGURAS 41 e 42) para o efeito extrato de levedura e açúcar mascavo no crescimento celular das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002:

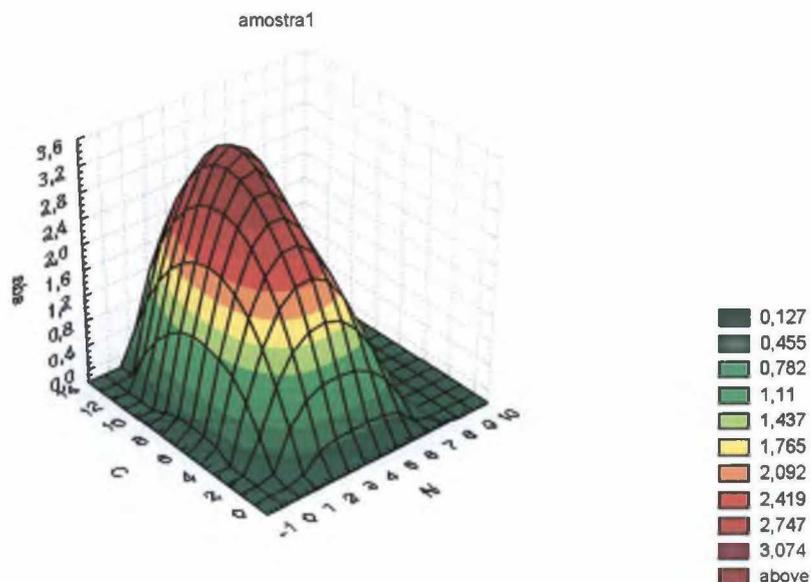
FIGURA 41 - EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCADO NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001

$$\text{Equação: } \text{ABS [N] [C]}/\text{ABS MRS} = 0,22661 - 0,15211 \cdot N + 0,54445 \cdot N \cdot C + 0,02644 \cdot N^2 - 0,09464 \cdot N^2 \cdot C - 0,0421 \cdot N \cdot C^2 + 0,0108 \cdot N^2 \cdot C^2$$

Onde:

N = % extrato de levedura;

C = % açúcar mascavo.



NOTA: ABS= CRESCIMENTO DA CEPA *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 EXPRESSO EM ABSORBÂNCIA EM MEIO ALTERNATIVO/ ABSORBÂNCIA EM CALDO MRS;
C= % EM AÇÚCAR MASCADO ADICIONADO NO MEIO DE CULTIVO;
N= % EM EXTRATO DE LEVEDURA ADICIONADO NO MEIO DE CULTIVO.

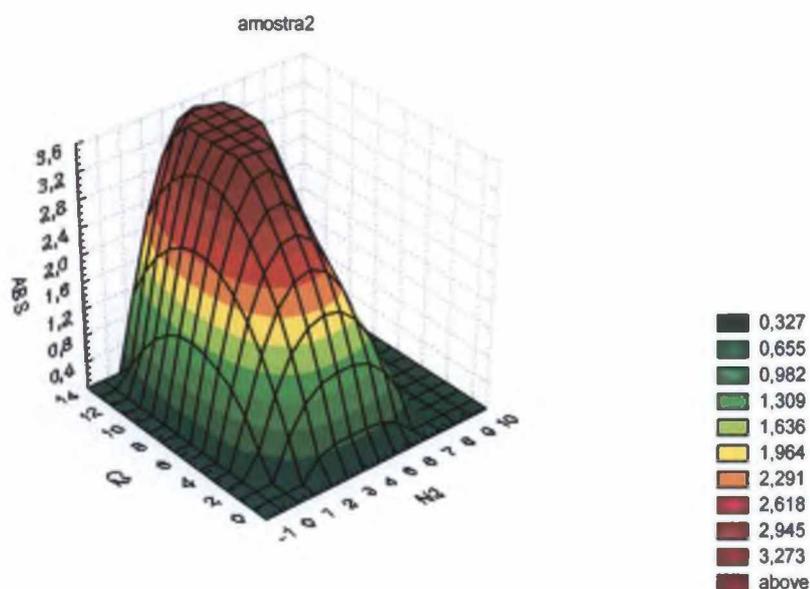
FIGURA 42 - EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E AÇÚCAR MASCADO NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002

$$\text{Equação: } \text{ABS [N] [C]}/\text{ABS MRS} = 0,19011 + 0,48411\text{NC} - 0,05627\text{N}^2\text{C} - 0,02709\text{NC}^2$$

Onde:

N = % extrato de levedura;

C = % açúcar mascavo.



NOTA: ABS= CRESCIMENTO DA CEPA *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 EXPRESSO EM ABSORBÂNCIA EM MEIO ALTERNATIVO/ ABSORBÂNCIA EM CALDO MRS;
C= % EM AÇÚCAR MASCADO ADICIONADO NO MEIO DE CULTIVO;
N= % EM EXTRATO DE LEVEDURA ADICIONADO NO MEIO DE CULTIVO.

Observou-se (ANEXO 3) que os efeitos de extrato de levedura, açúcar mascavo e de interação foram estatisticamente significativos para produção de biomassa das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002, ou seja, o comportamento do tratamento com açúcar mascavo tem efeito diferenciado quando submetidos as diferentes concentrações de extrato de levedura, onde as melhores concentrações para o crescimento celular da cepa *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 foram de 3,0509% para açúcar mascavo e 2,5758% para extrato de levedura; para

Lactobacillus sp LPB-P08-002 foram de 2,8197% para açúcar mascavo e 2,8735% para extrato de levedura.

4.9 ESTUDO CINÉTICO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DAS CEPAS ISOLADAS UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO

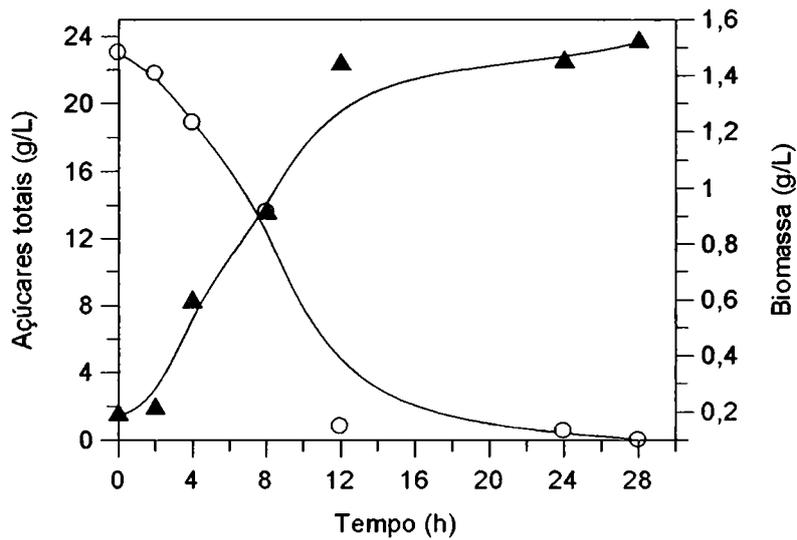
4.9.1 Formulação 1% de Extrato de Levedura e 4% de Açúcar Mascavo

Com o objetivo de estudar as cinéticas de *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 em relação à produção de biomassa e ácidos acético e láctico várias fermentações foram feitas a 37 °C, sob condições controladas e não controladas de pH, foram determinados: velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}), produtividade P_x (g/L h), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ (g.g^{-1}) e em ácidos orgânicos $Y_{p/s}$ (g.g^{-1}), usando meio alternativo com 1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo, pois é uma das formulações que apresentou melhores resultados no crescimento microbiano das cepas *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 (FIGURAS 39 e 40) e também utiliza o mínimo de extrato de levedura, componente mais caro na formulação.

As FIGURAS 43, 44, 45 e 46 mostram a produção de biomassa e consumo de açúcar das fermentações de *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001 e *Lactobacillus sp* LPB-P08-002 e as FIGURAS 45 e 46 também incluem a evolução de pH. Nas FIGURAS 43 e 44 o pH foram mantidos a um pH constante de 6,5 em todo período da fermentação e o açúcar foi quase totalmente consumido, enquanto que nas fermentações de pH não controlado (FIGURAS 45 e 46), o pH variou de 4,55 a 3,73 após 8 horas e o açúcar não foi completamente consumido; foram consumidos no fim da fase exponencial de 15,47–20,90% de açúcares, o conteúdo de biomassa foi similar com o experimento de pH controlado. Venkatesh, Okos e Wankat (1993) descreveram um incompleto consumo de açúcares disponíveis (17%) e um rápido crescimento de *Lactobacillus bulgaricus* (aproximadamente 10 horas) em meio sintético sem controle

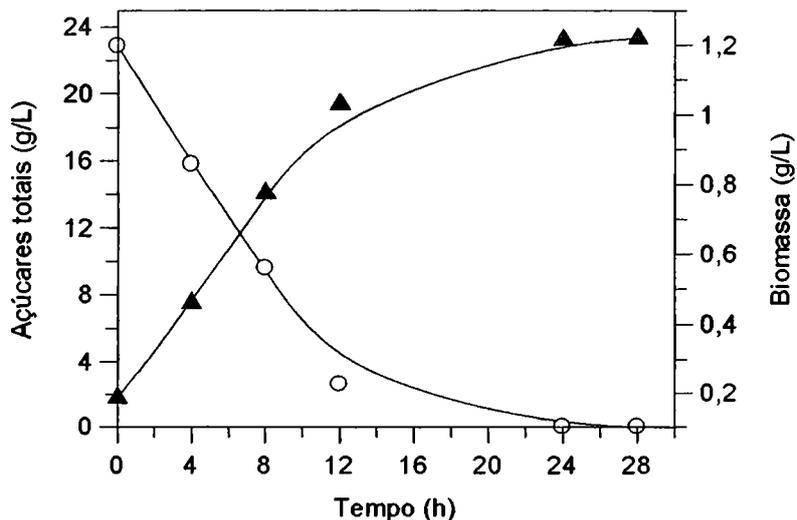
de pH, enquanto em pH constante de 5,6 foi observado um consumo de 90% em açúcares e uma fase exponencial longa (aproximadamente 18 horas).

FIGURA 43 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO



NOTA: ○ açúcares totais (g/L) e ▲ biomassa (g/L)

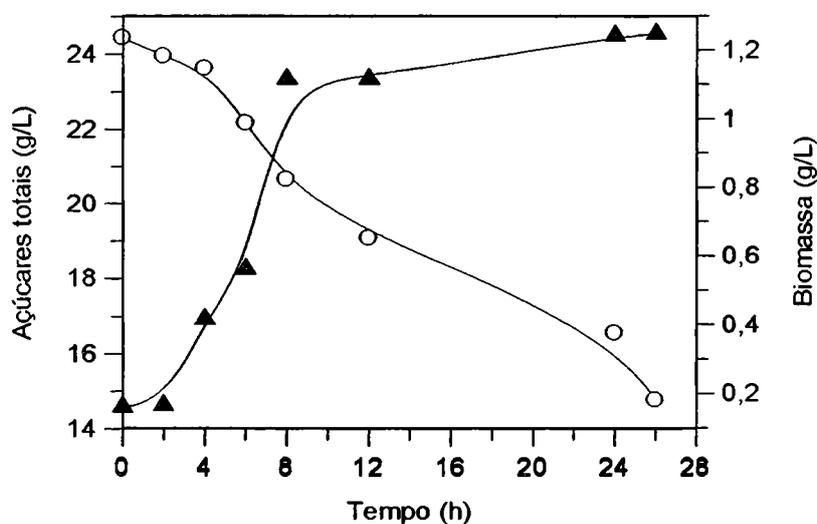
FIGURA 44 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO



NOTA: ○ açúcares totais (g/L) e ▲ biomassa (g/L)

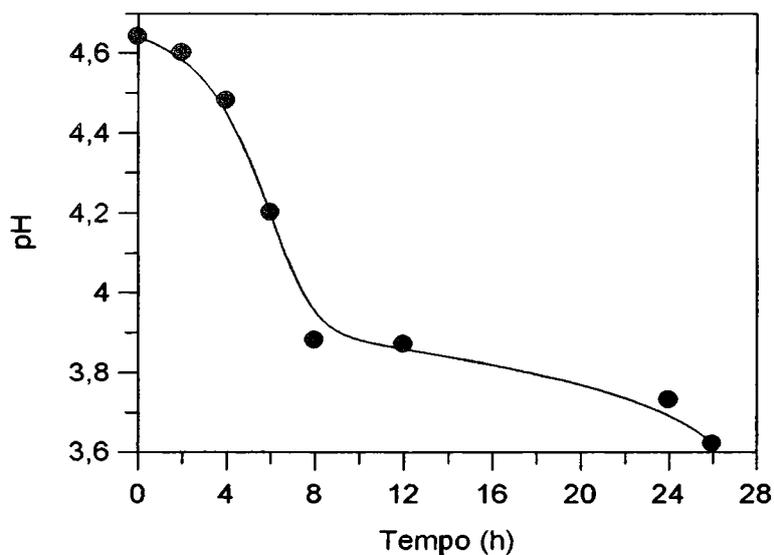
FIGURA 45 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



NOTA: ○ açúcares totais (g/L) e ▲ biomassa (g/L)

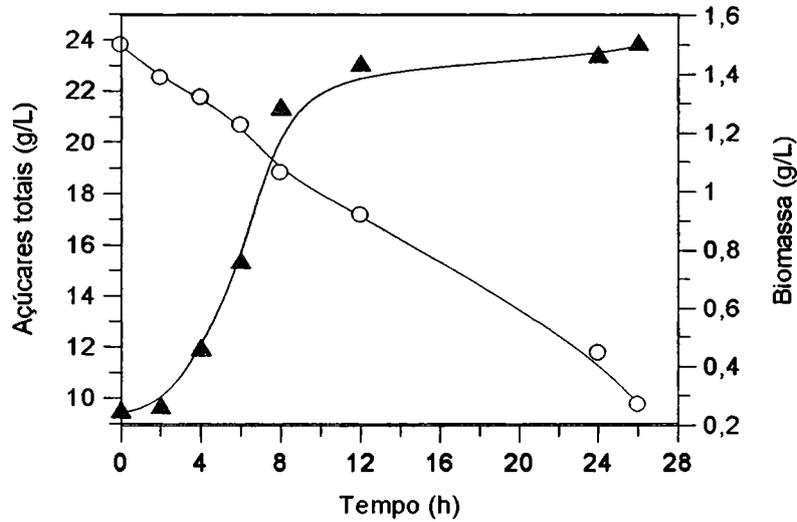
(B)



NOTA: ● pH

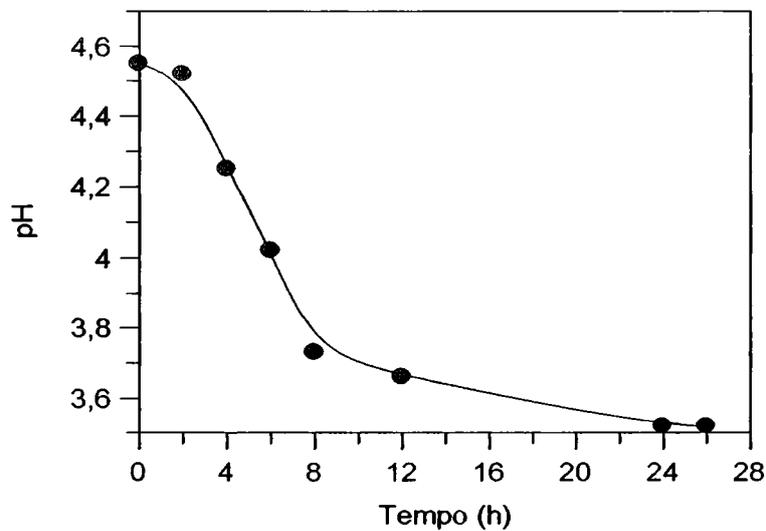
FIGURA 46 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



NOTA: ○ açúcares totais (g/L) e ▲ biomassa (g/L)

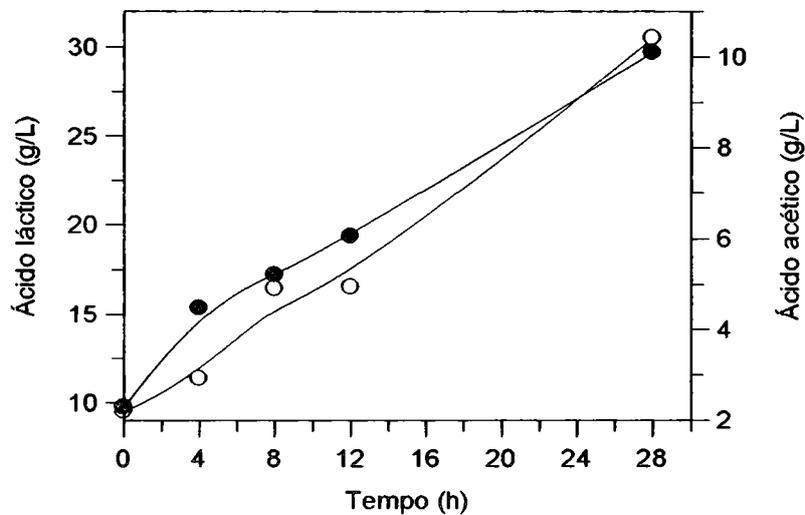
(B)



NOTA: ● pH

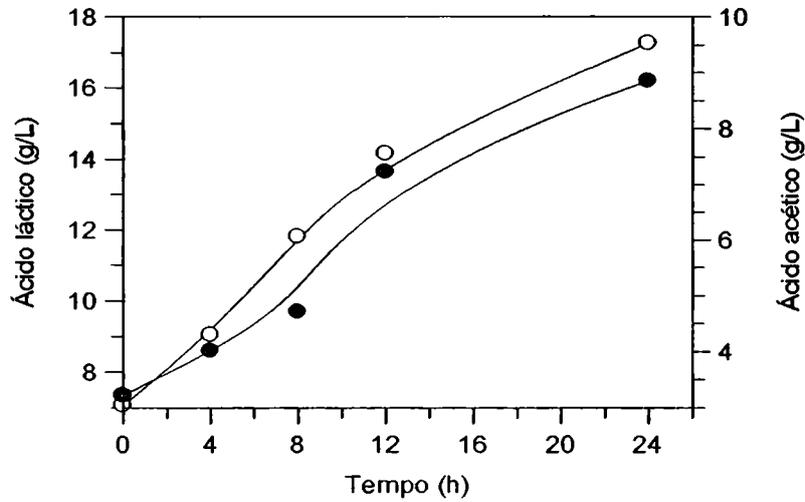
Os ácidos láctico e acético são produtos de interesse do metabolismo heterofermentativo de *Lactobacillus*, porque podem inibir microrganismos patogênicos (LÜCK, 1981). As evoluções da produção destes ácidos orgânicos sobre condições de controle de pH do meio a 6,5 (FIGURAS 47 e 48) e sem controle (FIGURAS 49 e 50) estão apresentadas a seguir.

FIGURA 47 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO COM MANUTENÇÃO DE pH a 6,5



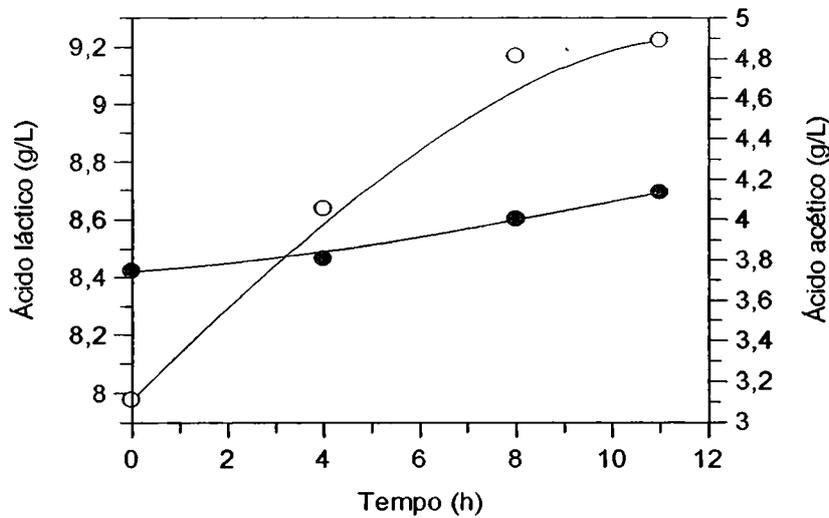
NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

FIGURA 48 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO *Lactobacillus sp.* LPB-P08-002 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO COM MANUTENÇÃO DE pH a 6,5



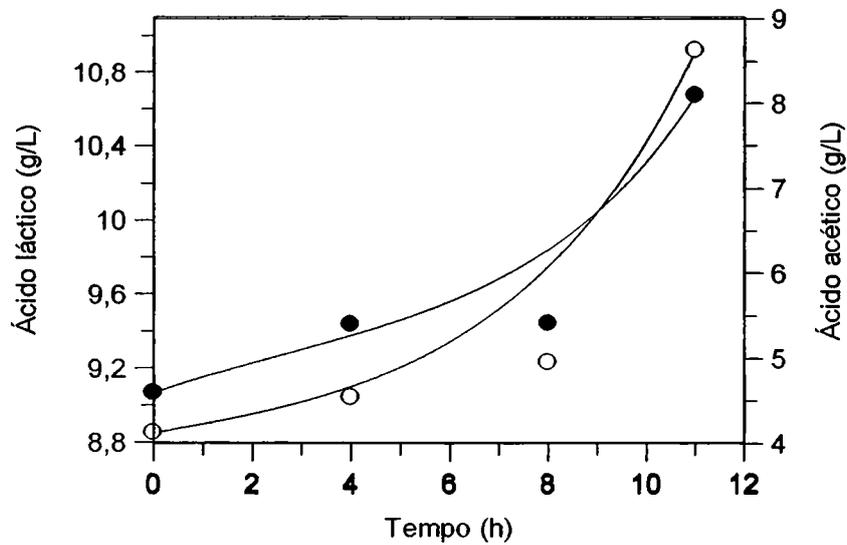
NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

FIGURA 49 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO SEM MANUTENÇÃO DE pH



NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

FIGURA 50 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus sp.* LPB-P08-002 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 1% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO SEM MANUTENÇÃO DE pH



NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

A fim de estudar os diferentes parâmetros cinéticos é necessário conhecer a velocidade específica de crescimento (FIGURAS 51, 52, 53 e 54), estes valores foram usados para calcular a produtividade em biomassa.

FIGURA 51 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO

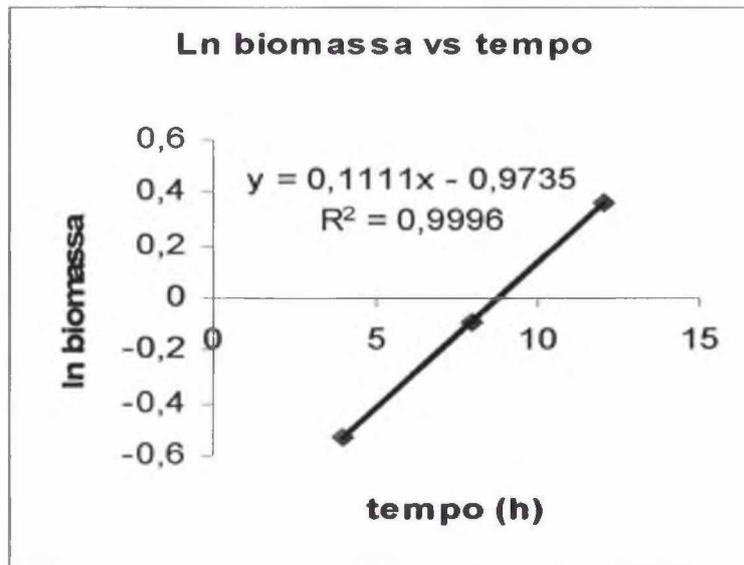


FIGURA 52 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 COM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCAVO

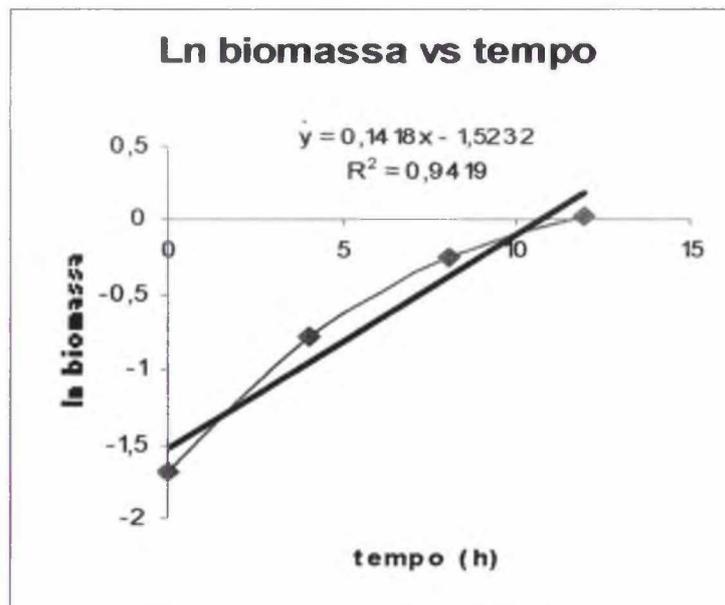


FIGURA 53 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO

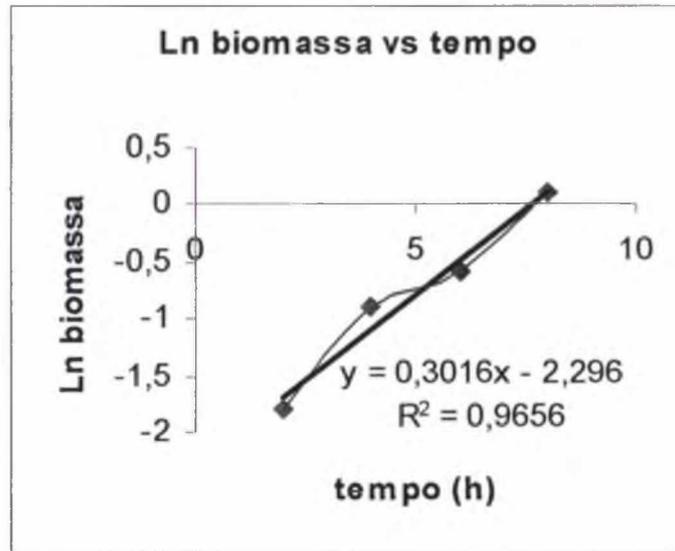
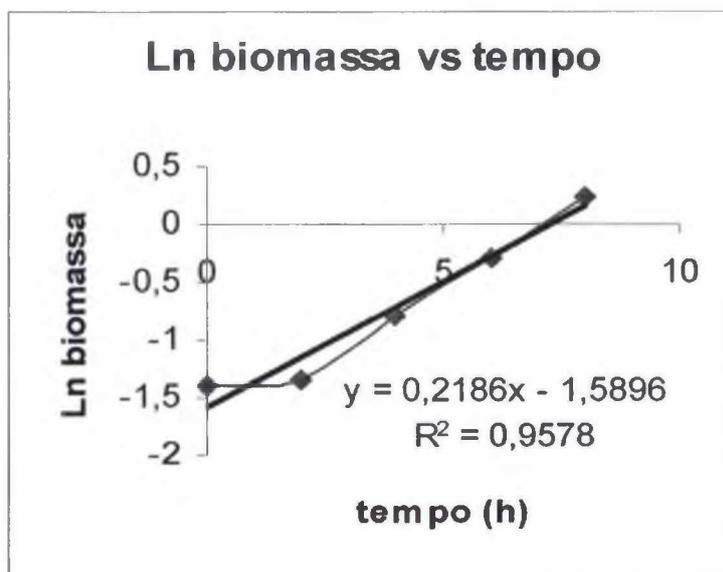


FIGURA 54 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 1% EXTRATO DE LEVEDURA E 4% DE AÇÚCAR MASCADO



Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos para biomassa e ácidos orgânicos são mostrados na TABELA 8.

TABELA 8 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 E *Lactobacillus sp.* LPB- P08-002

pH	Microrganismo	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})	Produtividade de biomassa P_x (g/L h)	Rendimento de biomassa $Y_{X/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	Rendimento de ácidos orgânicos $Y_{P/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)
(6,5) Com controle	<i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001	0,111	0,160	0,056	0,691
(6,5) Com controle	<i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002	0,142	0,146	0,042	0,548
Sem controle	<i>Lactobacillus reuteri</i> LPB-P01-001	0,302	0,284	0,253	0,384
Sem controle	<i>Lactobacillus sp.</i> LPB- P08-002	0,219	0,280	0,208	0,239

As fermentações com controle de pH (TABELA 8) apresentam baixo rendimento em biomassa, de acordo com Kandler e Weiss (1989) os *Lactobacillus* são microrganismos acidúricos, onde o pH ótimo usualmente é 5,5 - 6,2; o crescimento geralmente ocorre a pH 5 ou menos; a velocidade de crescimento é freqüentemente reduzida a pH neutro ou em reações inicialmente alcalinas.

As fermentações realizadas sobre condições de pH constante a 6,5 foram as que apresentaram melhores produções de ácidos orgânicos em relação às realizadas sem controle de pH. O pH, para propiciar elevado rendimento em ácidos orgânicos, deve-se situar nas proximidades da neutralidade ou na faixa levemente ácida. É importante manter o pH constante, pois conforme a acidez aumenta, ocorre uma inibição da fermentação (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

Como o objetivo é a produção de biomassa acreditamos que a condição sem controle de pH, cujos rendimentos em biomassa foram melhores, seria que melhor responderia nossos objetivos e que a cepa *Lactobacillus reuteri* LPB- P01-001, a qual apresentou os maiores valores de μ , P_x e $Y_{X/S}$, seria a mais indicada para ser escolhida. De acordo com Schmidell (2001) para um processo ser economicamente viável,

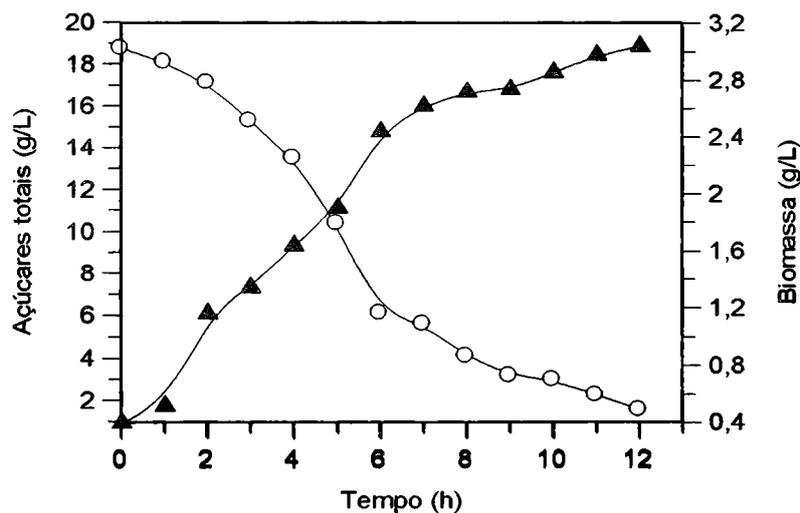
dependendo do sistema, é desejável isolar linhagens que demandem curtos tempos de fermentação, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, tenham exigência de aeração reduzida, ou que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo.

4.9.2 Formulação 2% de Extrato de Levedura e 3% de Açúcar Mascavo

Na tentativa de melhorar a produtividade em biomassa foi testada a formulação com 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo. A FIGURA 55 mostra a produção de biomassa, consumo de açúcar e a evolução de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 e a FIGURA 56 mostra a evolução da produção de ácidos orgânicos.

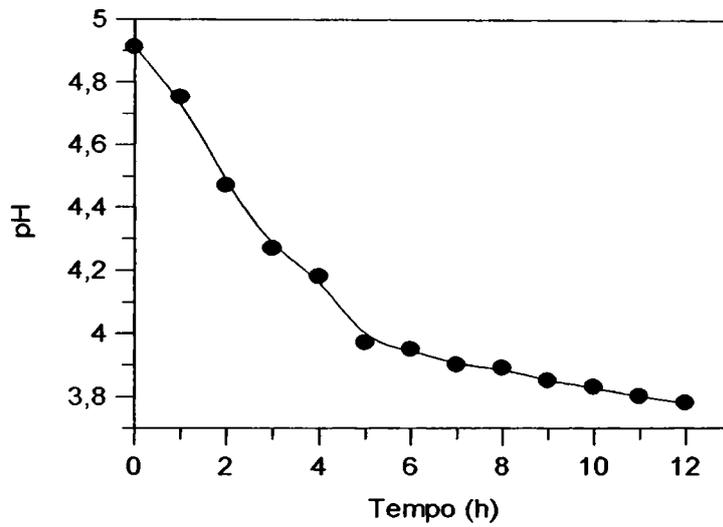
FIGURA 55 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCAMO, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



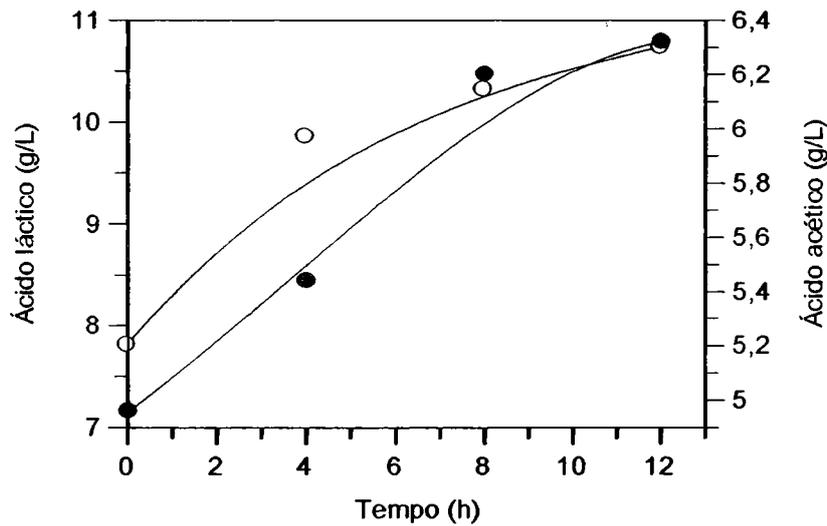
NOTA: \circ açúcares totais (g/L) e \blacktriangle biomassa (g/L)

(B)



NOTA: ● pH

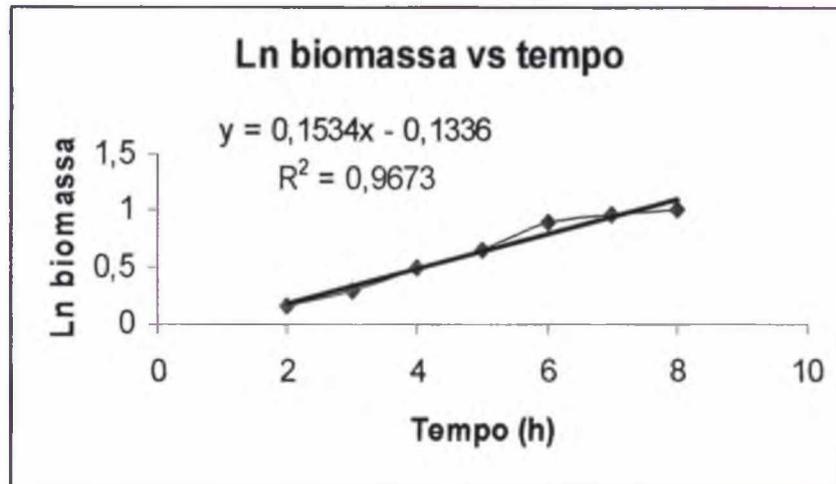
FIGURA 56 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCAVO SEM MANUTENÇÃO DE pH



NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

A FIGURA 57 apresenta o valor da velocidade específica de crescimento, este é utilizado para calcular a produtividade em biomassa.

FIGURA 57 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO



Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos para biomassa e ácidos orgânicos são mostrados na TABELA 9.

TABELA 9 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO COM 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO

pH	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})	Produtividade de biomassa P_x (g/L h)	Rendimento de biomassa $Y_{X/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	Rendimento de ácidos orgânicos $Y_{P/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)
Sem controle	0,153	0,416	0,158	0,256

O meio de composição com 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo foi superior em produtividade em biomassa como mostra na TABELA 9, quando comparado com o meio de composição 1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo (TABELA 8), estando este resultado de acordo com a análise estatística.

4.10 PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO FORMULAÇÕES EM MEIO BÁSICO BALANCEANDO

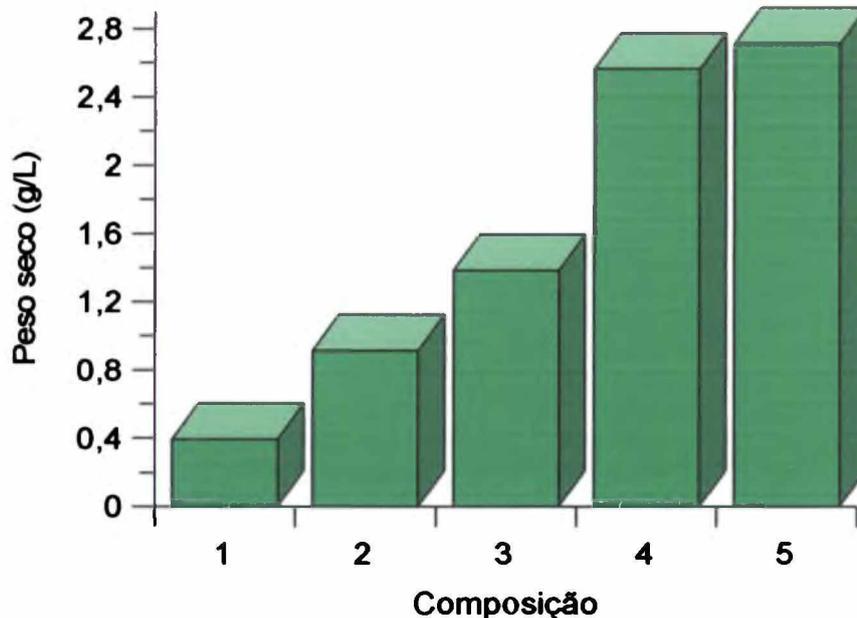
Para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com características nutricionais mal conhecidas, podem-se adicionar certos materiais complexos como: extrato de levedura (autolisado de leveduras), extrato de carne, extrato de malte e peptona (hidrolisado de proteínas). Esses materiais - individualmente ou adicionados conjuntamente - permitem introduzir ao meio de cultura os fatores faltantes em um meio definido, mas além de onerosos, são complexos e de composição variável ao longo do tempo de armazenagem, na dependência do fabricante e do lote empregado. Portanto, na tentativa de substituir o extrato de levedura por uma fonte menos onerosa, fez-se a estimativa do meio básico balanceado com uréia. A formulação do meio básico considerou a composição elementar do microrganismo a ser cultivado (35% de proteína na biomassa) e sua capacidade de converter substâncias químicas do meio de cultivo em massa celular (SCHMIDELL, 2001). Portanto, para se obter teoricamente 5 g de biomassa é necessária a adição de 0,06% de uréia. A formulação do meio básico foi de 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia (QUADRO 7), e verificado o crescimento da cepa *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em 24 horas no meio básico e na adição crescente de extrato de levedura (FIGURA 58).

QUADRO 7- ESTIMATIVA DO MEIO BÁSICO BALANCEADO

<u>Dados iniciais</u>	Dados	Unidades
Microorganismo	<i>Lactobacillus reuteri</i> LPB- P01-001	
% de proteína na biomassa	35	%
Fonte de carbono inicial	Açúcar mascavo	
Proporção açúcares no substrato inicial (para cada grama de açúcar mascavo)	0,625	g
Concentração inicial de açúcares no meio	18,75	g/L
Rendimento (biomassa/substrato) - $Y_{x/s}$	0,25*	
Fonte principal de nitrogênio	Uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)	
Proporção de nitrogênio na fonte principal (peso molecular da uréia: 60 g; com 47% de N)	0,47	
Cálculos teóricos		
Biomassa produzida (rendimento x substrato consumido)	5	g/L
Proteína produzida pela biomassa	1,75	g/L
Nitrogênio necessário (proteína produzida/6,25)	0,28	g/L
Quantidade da fonte de nitrogênio (uréia) a adicionar (0,28/0,47)	0,60	g/L
Quantidade da fonte de carbono a adicionar (18,75/0,625)	30	g/L
Meio básico		
Açúcar mascavo	30	g/L
Uréia	0,60	g/L

NOTA: * RENDIMENTO OBTIDO COM 10 g/L DE EXTRATO DE LEVEDURA E 40 g/L DE AÇÚCAR MASCAVO (25 g/L DE AÇÚCARES TOTAIS)

FIGURA 58 - CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO BÁSICO BALANCEADO COM URÉIA E CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DE EXTRATO DE LEVEDURA



NOTA: 1: 0% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
2: 0,5% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
3: 1% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
4: 2% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia;
5: 4% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia.

O meio básico balanceado com uréia (3% de açúcar mascavo e 0,06% de uréia) resultou em baixa produção de biomassa, indicando que o microrganismo necessita de um complexo nutricional (KANDLER; WEISS, 1989) encontrado no extrato de levedura. O uso de um determinado nutriente em quantidade menor que a desejada vai provocar limitação da ação microbiana. Por outro lado, o uso desse nutriente em quantidade maior que um determinado valor, poderá provocar inibição dessa ação (SCHMIDELL, 2001).

4.11 ESTUDO DO CRESCIMENTO CELULAR DO MEIO ALTERNATIVO COM ADIÇÃO DE URÉIA E FÓSFORO

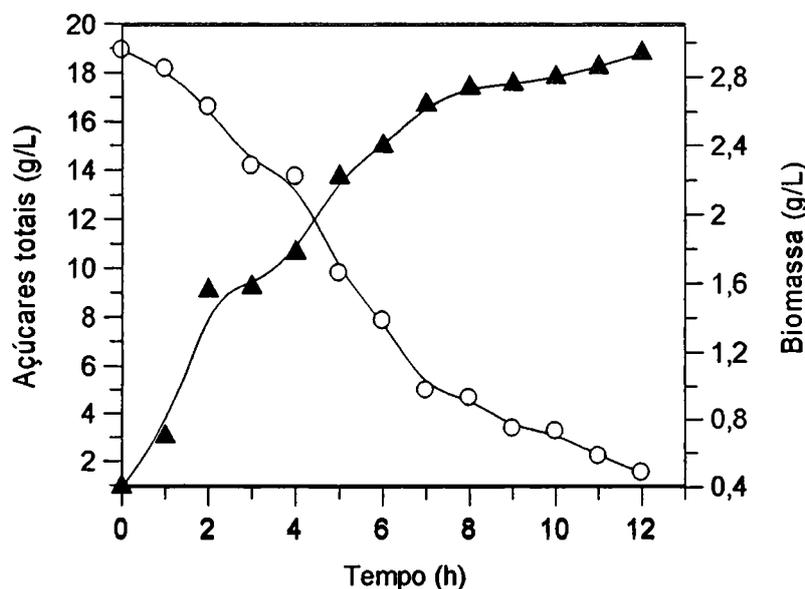
Algumas matérias-primas são de composição química desconhecida e meios de cultura contendo esses materiais naturais com frequência são completadas com alguns sais (particularmente contendo nitrogênio e fósforo) (SCHMIDELL, 2001).

4.11.1 Adição de Uréia

Com a intenção de aumentar a produtividade em biomassa de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 foi adicionado 0,06% de uréia (QUADRO 6) no meio composto de 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo. A FIGURA 59 mostra a produção de biomassa, consumo de açúcar e evolução de pH de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001.

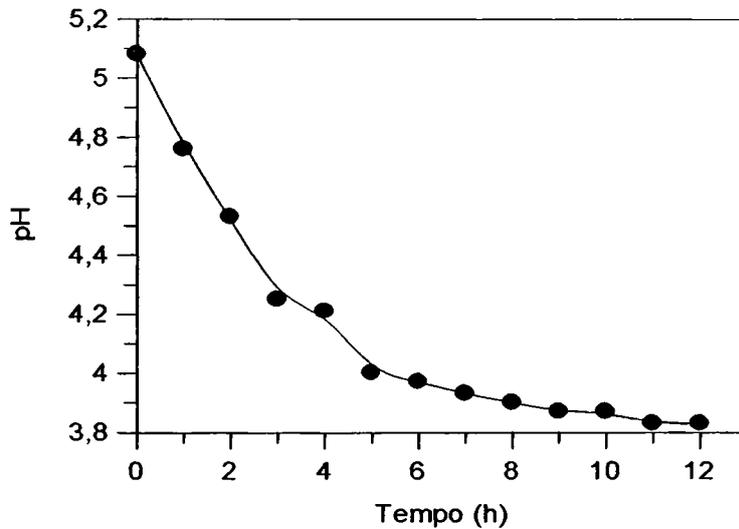
FIGURA 59 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCAVO E 0,06% DE URÉIA, ONDE: (A) CONSUMO DE AÇÚCAR E CRESCIMENTO MICROBIANO; (B) EVOLUÇÃO DO pH

(A)



NOTA: ○ açúcares totais (g/L) e ▲ biomassa (g/L)

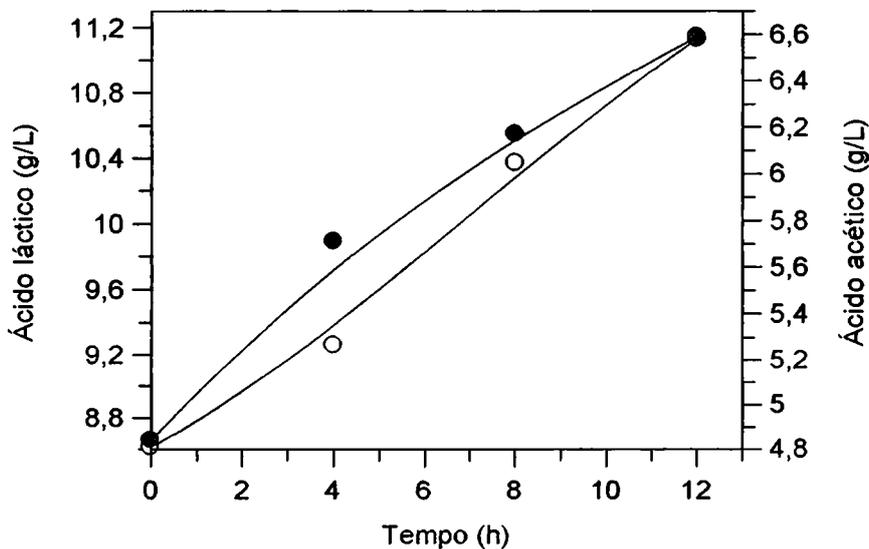
(B) EVOLUÇÃO DO pH



NOTA: ● pH

A evolução da produção de ácidos orgânicos em meio suplementado com uréia está apresentada na FIGURA 60.

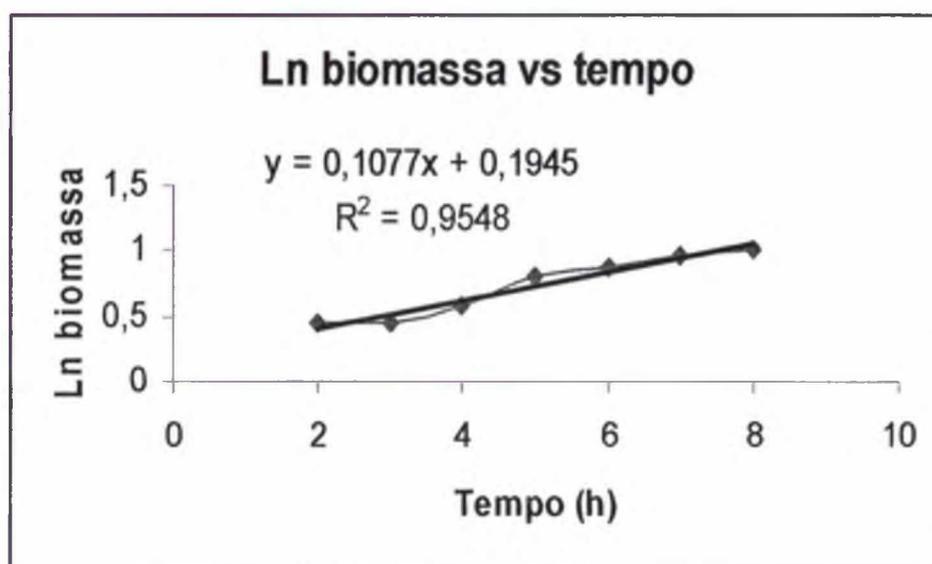
FIGURA 60 – PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO COMPOSTO DE 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA E 3% DE AÇÚCAR MASCADO COM ADIÇÃO DE URÉIA E SEM MANUTENÇÃO DE pH



NOTA: ○ Ácido láctico e ● ácido acético

Com o objetivo de estudar os diferentes parâmetros cinéticos é necessário conhecer a velocidade específica de crescimento (FIGURA 61), este valor foi usado para calcular a produtividade em biomassa.

FIGURA 61 - CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 SEM CONTROLE DE pH, COMPOSIÇÃO DO MEIO: 2% EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCADO E 0,06% DE URÉIA



Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos para biomassa e ácidos orgânicos são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO COM 2% DE EXTRATO DE LEVEDURA, 3% DE AÇÚCAR MASCADO E URÉIA

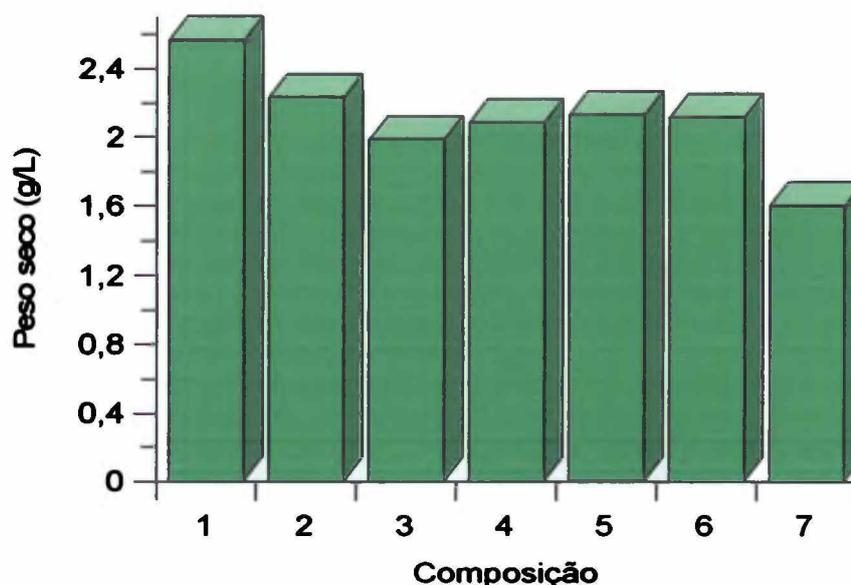
pH	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})	Produtividade de biomassa P_x (g/L h)	Rendimento de biomassa $Y_{x/s}$ ($g \cdot g^{-1}$)	Rendimento de ácidos orgânicos $Y_{p/s}$ ($g \cdot g^{-1}$)
Sem controle	0,108	0,296	0,164	0,217

A fermentação de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em meio com 2% de extrato de levedura, 3% de açúcar mascavo e uréia apresentou uma produtividade de biomassa de 0,296 g/L h, superior ao do meio com 1% de extrato de levedura (aproximadamente 4% superior, TABELA 8) e inferior à com 2% de extrato de levedura (aproximadamente 28,8% abaixo TABELA 9); portanto, a adição de uréia não afetou a produtividade de biomassa.

4.11.2 Adição de Fósforo

Observa-se que na FIGURA 62 não houve melhorias no crescimento celular, expresso em peso seco, após adição de fontes de fósforo, provavelmente devido à presença desta substância no açúcar mascavo (4,4%) e quantidades altas podem inibir o crescimento celular.

FIGURA 62 - CRESCIMENTO DE *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO BÁSICO BALANCEADO COM URÉIA ACRESCIDO DE EXTRATO DE LEVEDURA E FONTE DE FÓSFORO: FOSFATO MONOBÁSICO DE POTÁSSIO (KH_2PO_4) E FOSFATO DIBÁSICO DE POTÁSSIO (K_2HPO_4)



NOTA: 1: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 .
 2: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0,1% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 .
 3: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0,5% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 .
 4: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 1% de KH_2PO_4 e 0% de K_2HPO_4 .
 5: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0,1% de K_2HPO_4 .
 6: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 0,5% de K_2HPO_4 .
 7: 2% de N; 3% de C; 0,06% de uréia e 0% de KH_2PO_4 e 1% de K_2HPO_4 .

4.12 ANÁLISE ECONÔMICA PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CEPA *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO ALTERNATIVO

Para comparar o custo da produção de biomassa da cepa *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001, em meio de cultivo comercial MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) marca MERCK e em meio à base de açúcar mascavo e extrato de levedura, nas formulações: 1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo; 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo, foi realizada uma análise econômica dos meios para produzir 1 kilo da biomassa de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 (QUADRO 8).

Sendo: R\$ 87,70 (oitenta e sete reais e setenta centavos) para preparar um litro de caldo MRS;

R\$ 2,23 (dois reais e vinte e três centavos) para preparar um litro da formulação: 1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo;

R\$ 4,26 (quatro reais e vinte e seis centavos) para preparar um litro da formulação: 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo.

Apesar de, aparentemente, a formulação do meio alternativo com 2% de extrato de levedura ser o mais oneroso (R\$ 4,26/litro), em comparação com a composição de 1% de extrato de levedura (R\$ 2,23/litro), a produção de biomassa com 2% de extrato de levedura é mais eficiente e superior, barateando o seu custo.

O custo para produzir um kilo de probiótico em meio MRS é de R\$ 65,545 mil e no meio alternativo o valor é de R\$ 1,566 mil, ou seja, quarenta e duas vezes mais barato que o meio MRS.

QUADRO 8 - ANÁLISE ECONÔMICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CEPA *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 EM MEIO MRS E ALTERNATIVO

Composição	Biomassa em peso seco (g/L)	Custo para produzir 1 kg de probiótico (R\$)
caldo MRS	1,338	65 545,59
1% de extrato de levedura e 4% de açúcar mascavo	1,115	2 000,00 (33 vezes mais barato ao MRS)
2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo	2,72	1 566,18 (42 vezes mais barato ao MRS)

4.13 AVALIAÇÃO DA CEPA PROBIÓTICA *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 SOBRE O DESEMPENHO DE LEITÕES DESMAMADOS NA FASE DE CRECHE

Os resultados obtidos para ganho de peso diário (GPD), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) estão apresentados na TABELA 11.

Apesar de não haver diferença estatística significativamente, nota-se na fase 1 (23 a 35 dias de idade) um GPD de 50 g a mais para os leitões que receberam antibiótico e 28 g a mais para os que receberam probiótico (56% do efeito obtido pelo antibiótico), em relação aos que receberam somente dieta basal, assim como uma redução na conversão alimentar de 9,50% para o tratamento com antibiótico, enquanto os que receberam o probiótico tiveram uma CA ainda melhor, sendo 11,17% menor em relação aos que receberam a dieta basal na fase 1. Vassalo et al (1997) constataram diferenças significativas para o ganho de peso médio e incidência de diarreia para os leitões alimentados com rações contendo probióticos, onde a adição de probióticos nas rações para leitões na fase inicial de crescimento proporcionou aumento significativo no peso e controle eficaz na incidência de diarreia.

A primeira semana pós-desmame é considerada a fase de maior desafio para os leitões, pois a mudança causa estresse nutricional e ambiental com limitada capacidade de digestão (por produção insuficiente de ácido clorídrico, enzimas digestivas - amilase, lipase e tripsina pancreática - e à alteração súbita na forma física da dieta). Além disso, problemas imunológicos também afetam o desempenho pós-desmame, visto que a sua imunidade ainda não é completamente efetiva (APCS, 2005; LARPENT; CASTELLANOS; LARPENT, 1994).

TABELA 11 – GANHO DE PESO DIÁRIO (GPD), CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO (CDR) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DOS SUÍNOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS E PERÍODOS AVALIADOS.

	Dieta basal (média ⁽¹⁾ e o desvio padrão)	Antibiótico (média ⁽¹⁾ e o desvio padrão)	Probiótico (média ⁽¹⁾ e o desvio padrão)
<i>Fase 1</i> ⁽²⁾			
GPD (kg)	0,149 ± 0,022	0,199 ± 0,068	0,177 ± 0,030
CDR (kg)	0,260 ± 0,022	0,293 ± 0,016	0,275 ± 0,004
CA	1,79 ± 0,385	1,62 ± 0,668	1,59 ± 0,304
<i>Fase 2</i> ⁽²⁾			
GPD(kg)	0,306 ± 0,027	0,274 ± 0,270	0,313 ± 0,062
CDR (kg)	0,694 ± 0,081	0,664 ± 0,082	0,671 ± 0,068
CA	2,27 ± 0,232	2,43 ± 0,091	2,14 ± 0,197
<i>Fase 3</i> ⁽²⁾			
GPD(kg)	0,693 ± 0,120	0,726 ± 0,147	0,739 ± 0,027
CDR (kg)	1,553 ± 0,163	1,457 ± 0,212	1,537 ± 0,191
CA	2,30 ± 0,582	2,00 ± 0,161	2,09 ± 0,300
<i>Fase total</i> ⁽²⁾			
GPD(kg)	0,391 ± 0,048	0,405 ± 0,068	0,424 ± 0,021
CDR (kg)	0,857 ± 0,085	0,821 ± 0,097	0,847 ± 0,059
CA	2,22 ± 0,414	2,04 ± 0,149	1,99 ± 0,120

NOTA: ⁽¹⁾AS MÉDIAS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE.

⁽²⁾FASE 1 (23 A 35 DIAS DE IDADE), FASE 2 (35 A 54 DIAS DE IDADE), FASE 3 (54 A 72 DIAS DE IDADE) E NO PERÍODO TOTAL (23 A 72 DIAS DE IDADE).

Na fase 2 (35 a 54 dias de idade), observou-se que o desempenho dos leitões que receberam o probiótico (*Lactobacillus reuteri* LPB P01-001) foi superior em GPD e CA quando comparados aos que receberam a dieta basal e a dieta basal com antibiótico. Na fase 3 (54 a 72 dias de idade), nota-se que a conversão alimentar dos tratamentos com antibiótico e probiótico foram muito próximos, melhor do que a dieta basal.

Considerando o período total do experimento (de 23 a 72 dias de idade), a utilização de probiótico *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 na ração determinou maior ganho de peso diário e melhor conversão alimentar que as rações: basal e com antibiótico. Resultou em um GPD de 8,44% maior e uma CA de 10,36% menor quando comparados aos que receberam somente dieta basal. Da mesma maneira, os leitões tratados com antibiótico ficaram 3,58% mais pesados e com uma conversão

alimentar 8,11% menor do que os que receberam somente dieta basal. Estes resultados são semelhantes aos observados por Chang et al (2001), obtiveram bons resultados com o uso de *Lactobacillus reuteri* BSA 131 em suínos, como melhoramento na conversão alimentar e ganho de peso, sendo tais resultados encorajadores para o uso do probiótico em substituição de antibióticos usados rotineiramente como suplemento alimentar em suínos.

5 CONCLUSÃO

A cepa P01-001 de origem do estômago de suíno foi identificada pelo método DNA ribossomal 16S e confirmada por técnicas bioquímicas e fisiológicas como a espécie *Lactobacillus reuteri*.

O *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 é uma cepa com potencial probiótico: resistente a altas concentrações de bile, fenol e baixo pH, características importantes para melhor habilidade de sobrevivência no intestino.

O *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 fermenta várias formas de açúcares e glicerol, produz ácido láctico, ácido acético e reuterina, sendo possíveis substâncias com atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* hemolítica suína e *Staphylococcus aureus* causadores de diarreia.

O *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 é heterofermentativo, com característica microaerófila, cresce melhor em condições acidúricas, na temperatura de 37 e 45 °C, sendo de oito horas o tempo ótimo de crescimento, sem manutenção de pH.

É uma cepa com características nutricionais exigente, ou seja, necessita de um complexo nutricional encontrado no extrato de levedura. A formulação do meio desenvolvido com 2% de extrato de levedura e 3% de açúcar mascavo é a mais eficiente e de baixo custo, 42 vezes mais barato ao meio MRS (MERCK) na produção de biomassa de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001, com 0,416 g/L.h de produtividade em biomassa, velocidade específica de crescimento de 0,153 h⁻¹, rendimento de 15,8% em biomassa formada em relação ao consumo de açúcar e rendimento em produção de ácidos láctico e acético de 25,6%.

Os resultados obtidos pelo ensaio com os leitões sugerem que o probiótico *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 na dosagem utilizada apresentou efeitos similares ao antibiótico manifestado por ganho de peso diário, consumo diário de ração e conversão alimentar, podendo ser utilizado como substituto do antibiótico sulfato de neomicina como promotor de crescimento em ração para leitão desmamado na fase de creche, atendendo às exigências do mercado consumidor que está cada vez mais procurando um produto de melhor qualidade, e da comissão europeia que proibirão o

uso de antibiótico na ração animal a partir de 2006, o qual é considerado o maior comprador mundial de proteínas animais (UNIÃO, 2003).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar a aderência intestinal de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 em células teciduais e interação na aderência de patógenos.

Incluir sais minerais como magnésio, manganês e ferro em meio de cultura na tentativa de aumentar o crescimento celular de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001.

Substituir a fonte de nitrogênio, extrato de levedura, por um resíduo industrial.

Verificar a produção de exopolissacarídeos (glicana e frutana), com ação prebiótica, na espécie isolada e caracterizada como *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001.

Formas de conservação em longo prazo, por exemplo, o encapsulamento de células viáveis de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001.

Quantificar a reuterina proveniente da fermentação com glicerol e a aplicação desta em produtos lácteos, carnes como conservante.

Estudar os diferentes índices zootécnicos no período de crescimento-terminação em suínos utilizando *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001. Verificar se existe diferenças utilizando o probiótico em animais confinados ou não.

REFERÊNCIAS

ABDEL-BAR, N.; HARRIS, N. D.; RILL, R. L. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n.2, p. 411-415, 1987.

ABIPECS Em Foco. Informativo da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Participação do Brasil perante a produção mundial de carne suína**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/foco_45.pdf> acesso em 4 jan. 2006.

AGS – ASSOCIAÇÃO GOIANA DE SUINOCULTORES. **Classificação zoológica do suíno**. Disponível em: <<http://www.ags.com.br>> acesso em: 4 jan. 2006.

ANDREOTTI, R. Noções básicas de biologia celular e molecular. In: CURSO de biologia molecular aplicada à saúde animal, 1. 2000, Campo Grande. **Compilação dos trabalhos apresentados**. Campo Grande: EMBRAPA, p. 33-42, 2000.

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 403-412, 2003.

APCS - ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE SUÍNOS. AVESUI 2004. **Respostas fisiológicas de suínos à dietas com misturas de ácidos orgânicos**. Disponível em: <<http://www.apcs.com.br/7,1,26,6343.asp>> acesso em: 9 jan. 2005.

ÁVILA, F. A.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUINTANA, J. L.; BASSO A.; AMBROSIM, J. A. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 50, n. 5, p. 505-511, 1998.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, n.1, p.119-126, jan./jun., 2003.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar: o verde mar de energia**. São Paulo: Ícone, 1987. p.9-10.

BEUCHAT, L. R.; GOLDEN, D. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food Technology**, Chicago, n.1, p.134-142, 1989.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234 p.

BIOCONSERVAÇÃO de alimentos. Disponível em: <<http://www.alertamedico.med.br/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=123&Itemid=2>> Acesso em: 1 abr. 2005.

BIOLOGYCORNER. **Estrutura do DNA**. Disponível em: <<http://www.biologycorner.com/resources/DNA-colored.gif>> Acesso em: 24 abr. 2005.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, p. 123-178, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – métodos físicos e químicos.** Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n. 986, de 21 de outubro de 1969: referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos.** São Paulo, 1998, v.1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BUCHANAN; R. E. GIBBONS, N. E. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974; 1268p.

BRASÍLIA. CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. O uso do xarope de milho na merenda escolar. Disponível em: < <http://www.cfn.org.br/variavel/destaque/xaropemilho.htm>> Acesso em: 4 dezembro 2005.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHANG, Y. H; KIM, J. K; KIM, H. J; KIM, W. Y; KIM, Y. B; PARK, Y. H. Selection of a potencial probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 80, 193-199, 2001.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMPS, A. M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, p.36-40, 1993.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** Piracicaba, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia); Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 137 p.

CHUN, J. **Computer-Assisted Classification and Identification of Actinomycetes.** 1995. PhD Thesis, University of Newcastle upon Tyne (UK).

CME - Center for Microbial Ecology - Disponível em:
<<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>> Acesso em: 5 maio 2005.

COVENTRY, M. J.; WAN, J.; GORDON, J. B.; MAWSON, R. F.; HICKEY, M. W. Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, p.91-98, 1996.

DAVIS, G. H. G. The classification of *Lactobacilli* from the human mouth. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 481-493, 1955.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.23, p. 130-135, 1960.

- DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany –Disponível em:< <http://www.dsmz.de/strains/no020016.htm>> Acesso em: 26abr. 2005.
- DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p.136-151,1988.
- EL-ZINEY, M. G.; ARNEBORG, N.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 10, p. 913-916, 1998.
- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London Ontario, Canada, 30 abr. – 1 maio, 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ esn/food /foodandfood_probio_en.stm> Acesso em: 17 jan. 2005.
- FÁVERO, J. A. **Produção suínos**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos/manejoprodu.html#creche>> Acesso em: 31 ago. 2005.
- FERREIRA, A. M. T. Extração e análise de DNA. In: CURSO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À SAÚDE ANIMAL, 1. 2000, Campo Grande. **Compilação dos trabalhos apresentados**. Campo Grande: EMBRAPA, p. 33-42, 2000.
- FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K. C. K. Probióticos: uso de probióticos na alimentação de frango de corte. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 8, p. 40-43, 1999.
- FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Veterinary Medicine**, United States, v. 83, n. 8, p. 806-829,1988.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. **Probiotics the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992; 398 p.
- GÄNZLE, M. G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, p. 326-332, 2004.
- GEEL-SCHUTTEN, G. H.; FLESCHE, F.; BRINK, B.; SMITH, M. R.; DIJKHUIZEN, L. Screenig and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 50, p. 697-703, 1998.
- GILLILAND, S. E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 42, p. 164-167, 1979.
- GILLILAND, S. E.; STAEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p.30-45, 1984.
- GILLILAND, S. E.; WALKER, D. K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 905-911, 1990.

- GINÉS, S. C.; MALDONADO, M. C.; VALDEZ, G. F.. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. *Current Microbiology*, New York, v. 40, p. 181-184, 2000.
- GOMES, F. P.; LIMA, U. A. A cana-de-açúcar no mundo. In: CULTURA e adubação da cana-de-açúcar, São Paulo: Peri, 1964. 368 p.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E.; GÓMEZ-TREVIÑO, M. Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Cuba, v. 2, n. 3, p. 1-7, 2001.
- GONZALO, A.; LATRILLE, E.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Static and dynamic neural network models for estimating biomass concentration during thermophilic lactic acid bacteria batch cultures, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 85, n. 6, p. 6715-622, 1998
- HENRIQUE, A. P. F.; FARIA, D. E.; NETO, R. F.; ITO, D. T.; RODRIQUES, P. H. M. Uso de probióticos e antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, [S.l.]: FACTA, 1997, p. 27.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- HIJUM, S. A. F.T.; BONTING, K.; MAAREL, M.J.E.C.; DIJKHUIZEN, L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 205, p. 323-328, 2001.
- HISS, H. Cinética de processo fermentativos. In: BIOTECNOLOGIA industrial. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, p. 93-122.
- HOBLET, K. H.; HOHLER, E. M.; SAIF, L. J.; THEIL, K. W.; INGALLS, W.L. Study of porcine postweaning diarrhea involving K88 (-) hemolytic *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 47, n. 9, p. 1910-1912, 1986.
- HOLZAPFEL, W, H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, USA, v. 73, p. 365-373, 2001.
- HOWARD, J. C.; HEINEMANN, C.; THATCHER, B. J.; MARTIN, B.; GAN, B.S.; REID, G. Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus* spp. With surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight protein chip technology. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, n.10, p. 4396-4400, 2000.
- ICIDCA - Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-Açúcar. *Manual dos derivados da cana-de-açúcar*. Cuba: UNICA, 1999, 474 p.
- ISHIBASHI, N. Safety of probiotics: consideration of safety is very important for all probiotics. *The World of food ingredients*, Netherlands, Oct/Nov, p. 28-32, 2002.
- JAY, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 44, n. 3, p. 525-532, 1982.
- JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1994; p.442-449.

- JIN, L. Z.; HO, T. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **Word's Poultry Science Journal**, England, v. 53, p. 351-368, 1997.
- JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotics for pigs. In: **PROBIOTICS the scientific basis**, London: Chapman & Hall, p. 259-316. 1992.
- JONSSON, H.; STRÖM, E.; ROOS, S. Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 204, p. 19-22, 2001.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In: **BERGEY'S manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, v. 2, p. 1209-1234.
- KAPLAN, Ö; BAKIR, U. The effect of chemical crosslinking of invertase with dimethyl suberimidate on its pH stability. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 277-280, 1998.
- KAWAI, Y.; ISHII, Y.; UEMURA, K.; KITAZAWA, H.; SAITO, T.; ITOH, T. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 407-415, 2001.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.16, p.111-120,1980.
- KLERK, H. C.; SMIT, J. A. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v. 48, p. 309-316, 1967.
- KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p. 215-224, 2002.
- KWON, H-S; YANG, E-H; YEON, S-W; KANG, B-H; KIM, T-Y. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, p. 267-275, 2004.
- LANCINI, J. B. Fatores exogenous na função gastrointestinal-aditivos. In: **FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Fisiologia da Digestão e Absorção das Aves**. Campinas, 1994, p.99-126.
- LANE et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.
- LANE, D.J. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**,. John Wiley & Sons, Chichester, England, 1991.
- LARPENT, J. P.; CASTELLANOS, M. I.; LARPENT, J. L. **Les probiotiques en alimentation animale et humaine**. Paris: Technique & Documentation-Lavoisier, 1994, p. 153-171.
- LEME, JR. J.; BORGES, M. J. Açúcar de cana. Viçosa: Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1965. 328 p.

LEMIEUX, F.M.; SOUTHERN, L.L.; BIDNER, T.D. Effect of mannan oligosaccharides on growth performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 2482-2487, 2003.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia: Tecnologia das fermentações**, São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 286p.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial, processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 593 p.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.87, p.149-163, 1990.

LÜCK, E. **Conservacion química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1981. 243 p.

LUDKE, J.V.; LUDKE, M.C.M.M. **Produção de suínos com ênfase na preservação do ambiente**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2003/artigo-2003-n021.html;ano=2003>> Acesso em: 31 ago. 2005.

MACEDO, R. E. F. **Desenvolvimento de bebida Láctea fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala por cultura mista de *Lactobacillus casei shirota* e *Bifidobacterium adolescentis***. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química); Universidade Federal do Paraná, 141 p.

MACHADO, M. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de probióticos e sua utilização na alimentação de poedeiras comerciais**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química); Universidade Federal do Paraná, 89 p.

MADRUGA, C. R. Reação da polimerase em cadeia (PCR). In: CURSO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À SAÚDE ANIMAL, 1. 2000, Campo Grande. **Compilação dos trabalhos apresentados**. Campo Grande: EMBRAPA, p. 57-69, 2000.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, C.T. JR.; SAXMAN, P.R.; FARRIS, R.J.; GARRITY, G.M.; OLSEN, G.J.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 1, p.173-174, 2001.

MANIERI, J. M.; LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Avaliação tecnológica de açúcar mascavo**. Disponível em: <<http://www.propg.ufscar.br/publica/viicic/bioagra/ba061.htm>> Acesso em: 10 jul. 2004.

McALLISTER, J. S.; HAROLD, J.K.; SHORT, Jr. E. C. Changes in the intestinal flora of young pigs with postweaning diarrhea or edema disease. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 3, p.868-879, 1979.

McDONALD, L. C.; FLEMING, H. P.; HASSAN, H. M. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 7, p. 2120-2124, 1990.

MORELLI, L.; CESENA, C.; HAËN, C.; GOZZINI, L. Taxonomic *Lactobacillus* composition of feces from human newborns during the first fews days, **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 205-212, 1998.

MUKAI, T.; ASASAKA, T.; SATO, E.; MORI, K.; MATSUMOTO, M.; OHORI, H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 105-110, 2002.

MUTHUKUMARASAMY, P.; BUFFO, R.; HOLLEY, R. A. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. In: **IFT Annual Meeting**, Las Vegas, 2004. Disponível em: <http://ift.confex.com/ift/2004/techprogram/paper_25846.htm> Acesso em : 27 abr. 2005.

NCBI - National Center for Biotechnology Information **Taxonomy browser**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1598>> Acesso em : 25 abr. 2005a.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em : 5 maio 2005b.

NELSON, N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.153, p.375-380, 1944.

NEYSENS, P.; MESSENS, W.; GEVERS, D.; SWINGS, J.; VUYST, L. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. **Microbiology**, Great Britain, v. 149, p. 1073-1082, 2003.

OLIVEIRA, S. P. **Revisão - alimentos funcionais: aspectos relacionados ao consumo**. Disponível em: <http://www.revistafi.com.br/Main/revistas/ed_20/materias/revisao.htm> Acesso em: 21 jun. 2005.

OROBÓN, J. L. A. **Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos**. Madrid, 2003. Tese (Nutrición y Bromatología III); Universidad Complutense de Madrid, 187 p.

PADILHA, T. **Resistência antimicrobiana x produção animal: uma discussão internacional**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>> Acesso em: 1 ago. 2003.

PALMFELDT, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, p. 235-238, 2000.

PATEL, H. M.; PANDIELLA, S. S.; WANG, R.H.; WEBB, C. Influence of malt, wheat, and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 83-89, 2004.

PAQUETE, S. **Quais as diferenças entre açúcar cristal, refinado, demerara e mascavo?** Disponível em: <http://mundoestranho.abril.com.br/edicoes/36/ambiente/conteudo_mundo_60688.shtml> Acesso em: 22 jun. 2005.

PAVONE, P. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.magic-plants.com/plant_saccharum.htm> Acesso em: 5 nov. 2004.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciências Agrárias da Saúde**, Andradina, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2002.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, Barking, v. 67, p. 309-317, 2004.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Antibiose relacionada a cultivo de *Lactobacillus acidophilus* 1. Seleção de linhagem e estudo de meio de cultivo alternativo à base de soro de queijo. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v. 39, n. 2, p.247-257, jun., 1996.

PISSAIA, S. A. Avaliação do uso do cloreto de alumínio alcalinizado em substituição ao subacetato de chumbo na clarificação do caldo de cana-de-açúcar para análise polarimétrica. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química); Universidade Federal do Paraná, 72 p.

PRASAD, J.; McJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 2, p. 917-925, 2003.

REDDY, G. V.; SHAHANI, K. M.; FRIEND, B.A.; CHANDAN, R. C. Natural antibiotic activity of *L. acidophilus e bulgaricus*. III production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. *Cultured Dairy Products Journal*, Washington, v.18, n. 2, p.15-19, 1983.

REQUE, E. F. Isolamento, identificação e estudos fisiológicos da bactéria de ação probiótica (*Lactobacillus fermentum* LPB) para uso em frangos de corte. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química); Universidade Federal do Paraná, 94 p.

RIO DE JANEIRO. CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Instrução normativa n. 9 de 27 de junho de 2003 – MAPA. Disponível em: <<http://www.crmvrj.com.br/new/jornal/artigos/Jornal%20-%20Nov%202004.pdf>> Acesso em: 6 jun. 2005.

RIORDAN, N.H.; MENG, X.; TAYLOR, P. Effects of cell wall extracts of gram positive bacteria (MPGC) on human immunity and tumor growth in animals. Disponível em: <<http://www.Aidan-az.com/articles/mpgc.pdf>> Acesso em: 27 dez. 2004.

ROJAS, M.; ASCENCIO, F.; CONWAY, P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, n. 5, p.2330-2336, 2002.

ROOS, S.; ALELJUNG, P.; ROBERT, N.; LEE, B. WADSTRÖM, T. LINDBERG, M.; JONSSON, H. A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 144, p. 33-38, 1996.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. M.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos - Composição de alimentos e Exigências Nutricionais. 2. ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia, v. 1, 2005. 186 p.

ROTH, F. X. Ácidos orgânicos em nutrición porcina: eficácia y modo de acción. Disponível em: <<http://www.Jefo.ca/pdf/AcOrganicos.pdf>> Acesso em: 9 jan. 2005.

SAEED, S.; RASOOL, S. A.; AHMAD, S.; ALI, S.A. Immunological and toxicological studies of staphylococin bac 188 (a bacteriocin/bacteriocin-like inhibitory substance) on Experimental Animals. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Faisal-ab-ad, v. 7, n. 11, p. 1888-1892, 2004.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. Chicago, v.4, p. 406-425, 1987.

- SALDARRIAGA, F. T.; CALLE, S. E.; CAMACHO, C. S. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones lactantes criados en una granja tecnificada de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 11, n. 2, p.195-200, 2000.
- SAYAH, R. S.; KANEENE, J. B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. A. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic-and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n.3, p. 1394-1404, 2005.
- SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: BIOTECNOLOGIA industrial. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, p. 5-18, 2001.
- SEBRAE. **Estudo técnico das alternativas de aproveitamento da cana-de-açúcar**. Disponível em: <www.sebraemg.com.br/Geral/arquivo_get.aspx?cod_documento=15> Acesso em:22 jun.2005.
- SECRETION of bile and the role of bile acids in digestion. Disponível em: <<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/bile.html>> Acesso em: 7 jun. 2005.
- SILVA, E. N.; ANDREATTI, Fo, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. Trabalho apresentado no 2., Simpósio de Sanidade Avícola, 14 e 15 de setembro, Santa Maria, 2000.
- SILVEIRA, P. R. Conferência virtual internacional sobre qualidade de carne suína, 1, Concórdia. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/pork/silveira.html>> Acesso em: 10 maio 2005.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p.61-68, 1945.
- SONG, Y-L; KATO, N.; LIU, C-X; MATSUMIYA, Y.; KATO H., WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group-and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam,v. 187, p.167-173, 2000.
- SPENCER, R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus spp* on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, p. 215-220, 1994.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2 ed. New York: McGraw-hill, 1980.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNA MAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 40, n. 3, p.722-756, 1976.
- TAPIAS, G. Q.; LÓPEZ, J.H. Industrias carnicas. Bogotá. Disponível em: <<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/index.html>> Acesso em: 8 dez. 2005.
- TARANTO, M. P.; VALDEZ, G. F.; PEREZ-MARTINEZ, G. Evidence of a glucose próton motive force-dependent permease and a fructose phosphoenolpyruvate: phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 181, p. 109-112, 1999.

THE DIVERSITY of metabolism in prokaryotes. Disponível em:

<<http://textbookofbacteriology.net/metabolism.html>> Acesso em: 14 set. 2005.

TOIT, M.; FRANZ, C. M. A. P.; DICKS, L. M. T.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W. H. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 93-104, 1998.

TRAVIALIMENTOS. Probióticos. Disponível em:

<<http://www.travialimentos.com.br/probioticos.htm>> Acesso em: 11 jan. 2005.

TURNER, M. S.; GIFFARD, P. M. Expression of *Chlamydia psittaci* – and human immunodeficiency virus-derived antigens on the cell surface of *Lactobacillus fermentum* BR11 as fusions to bspA. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.10, p.5486-5489, 1999.

UNIÃO européia quer o fim dos aditivos em todos os alimentos. Disponível em:

<http://www.suino.com.br/busca/busca_noticia.asp?pf_id=18055&dept_id=1505> Acesso em: 1 ago. 2003.

VALDEZ, G. F.; DIEKMANN, H. Freeze-drying conditions of starter cultures for sourdoughs. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, p. 185-190, 1993.

VARELA, G. Fisiologia y metabolismo bacteriano, Disponível em:

<<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>> Acesso em: 27 jan. 2005.

VASSALO, M.; FIALHO, E. T.; OLIVEIRA, A. I. G.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G. Probióticos para leitões dos 10 aos 30 kg de peso vivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n.1, p.131-138, 1997.

VENKATESH, K. V.; OKOS, M. R.; WANKAT, P. C. Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. **Process Biochemistry**, Barking, v. 28, p. 231-241, 1993.

VIRTUAL. Estrutura do DNA. Disponível em:

<<http://www.virtual.epm.br/cursos/biomol/estrut/html/lignucl.htm>> Acesso em: 24 abr. 2005.

VISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 1447-1469, 1978.

WEISBURG et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, p.697-703, 1991.

WEGENER, H. C.; BAGER, F.; AARESTRUP, F. M. Vigilância da resistência aos antimicrobianos no homem, nos produtos alimentares e no gado na Dinamarca. **Eurosurveillance**, Saint Maurice, v. 2, n. 3, p. 17-19, 1997.

XANTHOPOULOS, V.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. **Food Microbiology**, London, v. 17, p.205-215, 2000.

YOUNG, A., BLAKESLEY, R., Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. **Focus**, San Francisco, v. 13, p.13. 1991.

YU, B.; TSEN, H. Y. *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.75, p.269-275,1993.

ANEXO 1 – LEGISLAÇÃO**INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003****Data de publicação: 30/06/2003****Situação: VIGENTE****Seção: 1****Página: 4**

Ementa: Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Histórico:

INSTRUÇÃO NORMATIVA38 - Revogada pela Instr. Normativa nº 09 de 27/06/2003

INSTRUÇÃO NORMATIVA67 - Revogada pela Instr. Normativa nº 09 de 27/06/2003

Revoga o Ofício Circular nº 06/99 SDA - OFÍCIO CIRCULAR 6

Os textos legais disponíveis no site são meramente informativos e destinados a consulta / pesquisa, sendo imprópria sua utilização em ações judiciais.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003.

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o Art. 87, da Constituição, tendo em vista o que dispõe o Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, Decreto 76.986 Regulamenta a Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, o Decreto nº 1.662, 6 de outubro de 1995, o Decreto nº 2.062, de 7 de novembro de 1996, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21.000.005292/2003-06 e 21.000.005646/2003 - 12, resolve:

Art. 1º Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Art. 2º Ficam cancelados a partir da vigência dessa Instrução Normativa as licenças e registros concedidos às matérias primas e aos produtos acabados para uso veterinários e suscetíveis de empregos na alimentação animal contendo os princípios ativos referidos no art. 1º, em decorrência da proibição nele contida.

Parágrafo Único Os produtos até então autorizados deverão ser retirados do comércio no prazo de 90 (noventa) dias, contados a partir da publicação da presente Instrução Normativa.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 4º Ficam revogadas a Instrução Normativa Nº 38, DE 8 de maio de 2002, a Instrução Normativa Nº 67, de 4 de dezembro de 2002, o Ofício Circular Nº 06/SDA e o Ofício Circular nº 1.271/CPV.

ROBERTO RODRIGUES

título: Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002

ementa não oficial: Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002

órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

alcance do ato: federal - Brasil

área de atuação: Alimentos

Toxicologia

relacionamento(s):

atos relacionados:

- [Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977](#)
- [Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969](#)
- [Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993](#)
- [Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997](#)
- [Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997](#)
- [Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998](#)
- [Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998](#)
- [Portaria nº 33, de 13 de janeiro de 1998](#)
- [Portaria nº 42, de 14 de janeiro de 1998](#)
- [Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998](#)
- [Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999](#)
- [Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999](#)
- [Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999](#)
- [Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999](#)
- [Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999](#)
- [Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000](#)
- [Resolução nº 23, de 15 de março de 2000](#)
- [Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001](#)

RESOLUÇÃO RDC N.º 2, DE 7 DE JANEIRO DE 2002

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto n.º 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o § 1º do art. 111 do Regimento Interno aprovado pela Portaria n.º 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 26 de dezembro de 2001,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de prevenção e controle sanitário na área de alimentos, visando à saúde da população;

considerando a possibilidade de efeitos benéficos de nutrientes e de substâncias bioativas dos alimentos;

considerando a necessidade de estabelecer condições para avaliação da segurança de uso de substâncias bioativas;

considerando a possibilidade de que as substâncias bioativas possam ser ingeridas em quantidades que causem efeitos adversos à saúde, a curto ou longo prazo;

considerando a possibilidade de ocorrência de interações entre as substâncias bioativas e nutrientes ou não nutrientes no organismo, com efeitos indesejáveis à saúde, a curto ou longo prazo;

adotou a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde, constante do anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresa têm o prazo até 28 de fevereiro de 2003 para se adequarem ao mesmo.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária sujeita aos dispositivos da Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

LUIS CARLOS WANDERLEY LIMA

ANEXO**REGULAMENTO TÉCNICO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E PROBIÓTICOS ISOLADOS COM ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAL E OU DE SAÚDE****1. ALCANCE****1.1. Objetivo**

Padronizar os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde.

1.2. Âmbito de Aplicação

O presente Regulamento Técnico se aplica às diretrizes a serem adotadas para a avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde.

1.2.1. Exduem-se desta categoria:

- chás;
- composto líquido pronto para consumo;
- alimentos para praticantes de atividade física;
- produtos cuja finalidade de uso indique ação terapêutica ou medicamentosa;
- produtos com ação farmacológica preventiva ou curativa definidas, mesmo de origem natural;
- produtos que contenham substâncias farmacológicas estimulantes, hormônios e outras consideradas como "dopping" pelo Comitê Olímpico Internacional - COI;
- produtos fitoterápicos, bem como suas associações com nutrientes ou não nutrientes;
- alimentos e ingredientes alimentares que contenham ou consistam em organismos geneticamente modificados - OGM;
- alimentos e ingredientes alimentares produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, mas que não o contenham;
- suplemento vitamínico e ou de mineral;
- alimentos para nutrição enteral;
- novos alimentos e ou novos ingredientes;
- produtos com Padrão de Identidade e Qualidade ou Regulamento Técnico específico.

2. DESCRIÇÃO

2.1. Definições

Para fins deste Regulamento Técnico, considera-se:

2.1.1. **Matéria-prima:** toda substância de origem vegetal ou animal, em estado bruto, que para ser utilizada como alimento precisa ser submetida a tratamento e/ou transformação de natureza física, química ou biológica.

2.1.2. **Nutriente:** é a substância química encontrada em alimento, que proporcione energia, e ou é necessária para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e da vida, e ou cuja carência resulte em mudanças químicas ou fisiológicas características.

2.1.3. **Probiótico:** microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

2.1.4. **Substância Bioativa:** além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica.

2.1.5. **Isolado(a):** entende-se como a substância extraída da sua fonte original.

2.2. Classificação

2.2.1. Os produtos de que trata este regulamento são classificados em:

2.2.1.1. Carotenóides;

2.2.1.2. Fitosteróis;

2.2.1.3. Flavonóides;

2.2.1.4. Fosfolipídeos;

2.2.1.5. Organosulfurados;

2.2.1.6. Polifenóis;

2.2.1.7. Probióticos

2.3. Designação

2.3.1. **Substância Bioativa:** é o nome da substância bioativa, seguido do nome da fonte da qual foi extraída a substância bioativa, acompanhada da forma de apresentação do produto.

2.3.2. **Probiótico:** é o nome do probiótico, acompanhado da forma de apresentação do produto.

2.3.3. Quando o produto for adicionado de vitaminas e ou de minerais, a designação deve ser seguida de uma das expressões previstas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais.

3. PRINCÍPIOS GERAIS

3.1. Do produto:

3.1.1. a substância bioativa deve estar presente em fontes alimentares. Pode ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano.

3.1.2. pode ser direcionado a grupos populacionais específicos.

3.1.3 não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica, qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como é ministrado.

3.1.4. deve ser seguro para o consumo humano, sem necessidade de orientação e ou acompanhamento médico, a não ser que seja dirigido a grupos populacionais específicos.

3.2. As alegações propostas pelo fabricante, são de caráter obrigatório e devem:

3.2.1. atender o disposto no Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos.

3.2.2. estar de acordo com as Políticas de Saúde definidas pelo Ministério da Saúde.

3.3. O fabricante do produto sujeito a este regulamento é responsável pela qualidade e eficácia do mesmo, devendo garantir sua segurança de uso no país.

3.4. A avaliação de risco e segurança do produto deve:

3.4.1. atender o disposto no Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.

3.4.2. demonstrar que o produto é seguro para o consumo nas condições de uso recomendadas .

3.4.3. ser avaliada, caso a caso, pela ANVISA.

3.4.4. considerar o uso da substância bioativa isolada, dentro do hábito alimentar da população brasileira.

4. REFERÊNCIAS:

4.1. BRASIL. Decreto-Lei n.º 986, de 12 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 21 de outubro de 1996.

4.2. BRASIL. Portaria MS n.º 1.428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, as Diretrizes para Boas Práticas de Produção, o Regulamento Técnico para estabelecimento de Padrões de

Identidade e Qualidade. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de dezembro de 1993.

4.3. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de outubro de 1997.

4.4. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - Definições, Classificação e Emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de outubro de 1997.

4.5. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 27, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

4.6. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de março de 1998.

4.7. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 33, de 13 de janeiro de 1998. Tabelas de Ingestão Diária Recomendada IDR. Diário Oficial da União de 16 de janeiro de 1998.

4.8. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 42, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

4.9. BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 685, de 27 de agosto de 1998. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 24 de setembro de 1998.

4.10. BRASIL. Lei n.º 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 27 de janeiro de 1999.

4.11. BRASIL. Resolução ANVS/MS n.º 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para o Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999.

4.12. BRASIL. Resolução ANVS/MS n.º 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999.

4.13. BRASIL. Resolução ANVS/MS n.º 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999.

4.14. BRASIL. Resolução ANVS/MS n.º 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico para Procedimento de Registro de Alimento com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em Sua Rotulagem. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 10 de dezembro de 1999.

4.15. BRASIL. Resolução RDC n.º 17, de 24 de fevereiro 2000. Regulamento Técnico sobre Registro de Medicamentos Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília 25 de fevereiro de 2000.

4.16. BRASIL. Resolução n.º 23, de 15 de março de 2000. Regulamento Técnico sobre o Manual de Procedimentos Básicos para o Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de março de 2000.

4.17. BRASIL. Resolução RDC n.º 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embaladas. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de março de 2001.

4.18. CODEX ALIMENTARIUS: CAC/GL 09-1987 (General Principles for the Addition of Essential Nutrients to Foods).

4.19. RDA/NRC/NAS (Recommended Dietary Allowance/National Research Council/National Academy of Science), USA, 1989.

4.20. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Department of Health and Human Services. Food Labeling. Code of Federal Regulations, Title 21, Parts 100 to 169. 21CFR101.9.

5. COMPOSIÇÃO E REQUISITOS

5.1. A composição e requisitos referem-se ao produto pronto para o consumo.

5.2. É proibida a composição que necessite a preparação por infusão.

5.3. Vitaminas e ou Minerais podem ser adicionados, desde que o consumo diário do produto indicado pelo fabricante não ultrapasse 100% da IDR e não prejudique a biodisponibilidade de qualquer dos componentes do produto.

5.4. Nenhuma substância nociva ou inadequada deve ser introduzida ou formada como consequência de processamento com o propósito de estabilização.

6. ADITIVOS

6.1. É permitida a utilização dos aditivos, coadjuvantes de tecnologia e veículos nos mesmos limites previstos no Regulamento Técnico sobre o Uso dos Aditivos Alimentares, Coadjuvantes de Tecnologia e Veículos para Suplementos Vitamínicos e ou Minerais.

7. CONTAMINANTES

7.1. Resíduos de agrotóxicos

Devem estar em consonância com os níveis toleráveis nas matérias-primas empregadas, estabelecidos pela legislação específica.

7.2. Contaminantes inorgânicos e orgânicos.

Devem obedecer aos limites estabelecidos pela legislação específica.

8. HIGIENE

O Produto sujeito a este regulamento deve ser preparado, manipulado, acondicionado e conservado conforme as Boas Práticas de Fabricação (BPF), bem como atender aos padrões microbiológicos, microscópicos e físico-químicos estabelecidos pela legislação específica.

9. FORMAS DE APRESENTAÇÃO

9.1. O produto sujeito a esta norma deve ser apresentado nas formas sólida, semi-sólida ou líquida, tais como: tabletes, comprimidos, drágeas, pós, cápsulas, granulados, pastilhas, soluções e suspensões.

9.2. O produto deve ser acondicionado em embalagem adequada à manutenção de suas características até o final do prazo de validade.

9.3. O produto somente pode ser vendido em unidades pré-embaladas, não sendo permitida a venda fracionada.

10. PESOS E MEDIDAS

Deve obedecer à legislação específica.

11. ROTULAGEM

11.1. O Produto sujeito a este regulamento deve atender ao Regulamento Técnico específico de Rotulagem de Alimentos Embalados e de Rotulagem Nutricional obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados.

11.2. Quando qualquer Informação Nutricional Complementar for utilizada, esta deve atender à norma específica.

11.3. Conter alegação de propriedades funcional e ou de saúde, em caráter obrigatório, devendo apresentar-se nos moldes e dizeres aprovados pela ANVISA.

11.4. O modo de uso do produto (quantidade, frequência, condições especiais) e modo de preparo, quando for o caso.

11.5. As expressões em destaque e em negrito:

"Consumir somente a quantidade indicada na embalagem."

"Gestantes, nutrízes e crianças somente devem consumir este produto sob orientação de nutricionista ou médico."

11.6. Cuidados de conservação e armazenamento, antes e depois de abrir a embalagem, quando for o caso.

11.7. Alerta de forma clara e em destaque, para os grupos populacionais específicos que não podem consumir o produto, quando for o caso.

11.8. As alegações devem estar associadas à quantidade de uso recomendada pelo fabricante;

11.9. Outras advertências específicas poderão ser definidas pela ANVISA e sua inclusão nos dizeres de rotulagem será obrigatória.

11.10. No caso de Substância Bioativa, deve constar, a quantidade em que está presente na porção diária recomendada pelo fabricante. Esta declaração deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e não deve fazer parte da Tabela de Informação Nutricional.

11.11. No caso dos Probióticos, deve constar a quantidade dos microorganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e fora da Tabela de Informação Nutricional.

12. PROPAGANDA

12.1. Deve atender ao disposto no Decreto-Lei 986, de 12 de outubro de 1969 e ao Regulamento Técnico específico sobre propaganda de alimentos.

12.2. Qualquer informação sobre as propriedades do produto, veiculada por qualquer meio de comunicação, não pode ser diferente daquela aprovada para a rotulagem.

12.3. Qualquer folheto que venha a acompanhar o produto não pode veicular informações diferentes daquelas aprovadas para a rotulagem.

13. REGISTRO

13.1. O produto sujeito a este regulamento deve atender os mesmos procedimentos administrativos exigidos para o registro de alimentos em geral.

13.2. O processo de pedido de registro do produto sujeito a este regulamento deve estar instruído com laudo de análise, a fim de comprovar os teores de contaminantes inorgânicos, conforme o caso, seguindo a determinação da ANVISA, e o(s) teor(es) da(s) referida(s) substância(s) bioativa(s) ou probiótico(s) presente(s) no produto.

14. DISPOSIÇÕES GERAIS

14.1. O presente Regulamento poderá ser revisado após 2 (dois) anos da sua publicação.

14.2. A ANVISA pode requerer estudos e ou acompanhamento pós-comercialização (post marketing) dos produtos sujeitos a este regulamento.

14.3. Cabe à empresa, responsável pela produção do produto, comunicar imediatamente à ANVISA qualquer informação

adicional que implique numa reavaliação de risco e segurança de uso do produto.

14.4 Para produtos não previstos neste Regulamento Técnico:

14.4.1 deve atender o disposto no Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.

14.4.2. dependendo da finalidade de uso, o produto poderá ser objeto de análise pelo Regulamento Técnico que aprova Procedimentos para o Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes ou pelo Regulamento Técnico que aprova Procedimentos de Registro de Alimento com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em Sua Rotulagem.

ANEXO 2 - BUSCA DE SIMILARIDADE DA SEQUÊNCIA DE rDNA 16S DA AMOSTRA LPB - P01- 001 NA BASE DE DADOS RDP

SEQUENCE_MATCH version 2.7

written by Niels Larsen.

Short-ID :LPB-P01-001
 Full name :LPB-P01-001, 983 bases, 889D6861 checksum.
 Sequence :943 unique oligos.
 RDP data :Small Subunit rRNAs with Prokaryotic tree
 Comments:A minimum of 100 unique oligos required
 :A total of 166 sequences were excluded
 :34362 sequences were included in the search
 :The screening was based on 7-base oligomers
 Date :Thu Apr 14 13:36:02 2005
 CPU time :0.39 seconds

BACTERIA

GRAM_POSITIVE_BACTERIA

BACILLUS-LACTOBACILLUS-STREPTOCOCCUS SUBDIVISION

LACTOBACILLI

L.DELBRUECKII SUBGROUP

L.acidoph2 0.6241460Lactobacillus acidophilus subsp. johnsonii str. BMF 6Lb6 LAB 82
L.johnsoni 0.6221392Lactobacillus johnsonii ATCC 33200 (T)

L.REUTERI SUBGROUP

L.fermentm 0.6881454Lactobacillus fermentum ATCC 14931 (T)
U62624 0.7031415Lactobacillus fermentum str. KRM
AF197126 0.7661486Lactobacillus G24 str. G24
L.pontis 0.8071486Lactobacillus pontis str. LTH 2587
L.reuteri 0.8181453Lactobacillus reuteri str. F275 DSM 20016 (T)
L.reuteri3 0.9071474Lactobacillus reuteri str. F275 DSM 20016 (T)
AF126738 0.7961483Lactobacillus mucosae str. S32(T)
L.panisl 0.7951400Lactobacillus panis DSM 6035 (T)
L.oris 0.6891229Lactobacillus oris NCDO 2160 (T)
L.oris2 0.8091426Lactobacillus oris DSM 4864 (T)

L.CASEI SUBGROUP

D86518 0.6261438Lactobacillus casei str. (=) JCM 8129
L.zeae1 0.6221436Lactobacillus zeae ATCC 15820 (T)

UNCLASSIFIED / UNALIGNED

AB017358 0.816 478Lactobacillus reuteri str. F275 JCM 1112 (T).
AB029407 0.706 534unnamed organism.
LFU62624 0.7031415Lactobacillus fermentum 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.
AF175756 0.649 194clone DGGE band #16.
D86516 0.6221436Lactobacillus zeae DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence.
LAAJ2515 0.6221392Lactobacillus johnsonii 16S rRNA gene.

ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES OBTIDOS PARA AS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO MEIO ALTERNATIVO

Amostra 1 (P01-001)

Intervalo de confiança para média à 5% de probabilidade

N	C					Média	N	C				Média
	4.0	5.0	6.0	9.0				0	0.25	1.0	3.0	
0.0	0.1130±0.0030	0.0980±0.0086	0.0796±0.0064	0.1086±0.0049	0.0998±0.0046		2.0	0.1310±0.0055	0.1983±0.0078	0.6723±0.0161	2.0430±0.0590	0.7611±0.2322
0.5	1.0123±0.0136	0.9720±0.0266	0.8970±0.0392	0.8606±0.0103	0.9355±0.0209		4.0	0.1716±0.0026	0.1926±0.0051	0.4906±0.0377	1.4736±0.0701	0.5821±0.1606
1.0	2.0090±0.1650	1.5686±0.0520	1.6633±0.0084	1.5903±0.0335	1.7078±0.0653		6.0	0.1920±0.0030	0.2553±0.0120	0.3613±0.0039	1.2923±0.0738	0.5252±0.1357
Média	1.0447±0.8795	0.8795±0.2142	0.8800±0.2289	0.8532±0.2141			Média	0.1648±0.0091	0.2154±0.0109	0.5081±0.0466	1.6030±0.1180	

Análise de variância

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrados tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
N	4	15.88575494	3.97143874	639.78	<.0001
C	6	12.35434753	2.05905792	331.70	<.0001
N*C	12	0.93047772	0.07753981	12.49	<.0001

Decomposição dos graus de liberdade do efeito interação via análise de regressão polinomial

P-valor para o teste F para o efeito C

Regressão		C							
		0.0	0.25	1.0	3.0	4,0	5,0	6,0	9,0
Linear	p-valor	<.0001	0.0193	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.9194	0.5663	0.9260	0.8422	0.9696	0.9820	0.9970	0.9976
Quadrático	p-valor	0.0001	0.0043	0.0003	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.9534	0.8376	0.9347	0.9172	0.9704	0.9937	0.9974	0.9977

P-valor para o teste F e coeficiente de determinação para o efeito N

Regressão		N					
		0.0	0.50	1.0	2.0	4,0	6,0
Linear	p-valor	0.9576	0.0020	0.0958	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.0003	0.6331	0.2526	0.9935	0.9804	0.9530
Quadrático	p-valor	0.0082	0.0035	0.0517	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.6566	0.7156	0.4822	0.9958	0.9875	0.9849
Cúbico	p-valor	0.0203	0.0103	0.0253	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.6877	0.7380	0.6690	0.9968	0.9888	0.9861

Modelo para Superfície de resposta

Fator	Coefficiente	Erro Padrão	Teste t	t-valor
Intercepto	0.2266	0.05659	4	0.0002
n	-0.1521	0.05786	-2.63	0.0107
nc	0.5445	0.039	13.96	<.0001
n ²	0.0264	0.01029	2.57	0.0125
n ² c	-0.0946	0.01037	-9.13	<.0001
nc ²	-0.0421	0.00522	-8.07	<.0001
n ² c ²	0.0108	0.00256	4.22	<.0001

Máximo C = 3.0509

Máximo N = 2.5758

Amostra 2 (P08-002)

Intervalo de confiança para média à 5% de probabilidade

N	C					Média	N	C				Média
	4.0	5.0	6.0	9.0	0			0.25	1.0	3.0		
0.0	0.1396±0.0044	0.1953±0.0193	0.0536±0.0026	0.1373±0.0103	0.1315±0.0159	2.0	0.1523±0.0036	0.2386±0.0043	0.9003±0.0146	2.0000±0.0887	0.8228±0.2235	
0.5	1.0993±0.0248	1.1410±0.0072	1.133±0.0190	1.057±0.00096	1.1075±0.0121	4.0	0.1650±0.0020	0.3266±0.0317	0.9716±0.0139	1.7040±0.1216	0.7918±0.1849	
1.0	2.0296±0.1203	1.8213±0.041	1.8133±0.0140	1.7363±0.0779	1.8501±0.0458	6.0	0.1750±0.0025	0.4056±0.0141	0.8643±0.0118	1.6476±0.0958	0.7731±0.1708	
Média	1.0895±0.2751	1.0525±0.2361	1.0000±0.2562	0.9768±0.2327		Média	0.16410.0035±	0.3236±0.0261	0.9121±0.0171	1.7838±0.0751		

Análise de variância

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrados tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
N	4	17.84704	4.46176	618.46	<.0001
C	6	14.57608	2.429347	336.74	<.0001
N*C	12	0.376359	0.031363	4.35	0.0001

Decomposição dos graus de liberdade do efeito interação via análise de regressão polinomial

P-valor para o teste F para o efeito C

Regressão		C							
		0.0	0.25	1.0	3.0	4,0	5,0	6,0	9,0
Linear	p-valor	0.0005	0.0004	0.4282	0.0451	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.8405	0.8492	0.0917	0.4585	0.9833	0.9880	-0.9824	0.9831
Quadrático	p-valor	0.0038	0.0034	0.0037	0.1044	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.8444	0.8500	0.8449	0.5292	0.9833	0.9968	0.9993	0.9905

P-valor para o teste F e coeficiente de determinação para o efeito N

Regressão		N					
		0.0	0.50	1.0	2.0	4,0	6,0
Linear	p-valor	0.7249	0.0324	0.0623	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.0129	0.3812	0.3056	0.9074	0.8188	0.8651
Quadrático	p-valor	0.3541	0.0084	0.0596	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.2060	0.6541	0.4657	0.9890	0.9768	0.9844
Cúbico	p-valor	0.0002	0.0222	0.1081	<.0001	<.0001	<.0001
	r ²	0.9092	0.6800	0.5128	0.9926	0.9787	0.9851

Modelo para Superfície de resposta

Fator	Coefficiente	Erro Padrão	Teste t	t-valor
Intercept				
o	0.19011	0.03899	4.88	<.0001
nc	0.48411	0.02895	16.73	<.0001
n ² c	-0.05627	0.00369	-15.23	<.0001
nc ²	-0.02709	0.0033	-8.2	<.0001

Máximo C = 2,8197

Máximo N = 2,8735

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PROGRAMAS DE ALIMENTAÇÃO, NOS DIFERENTES PERÍODOS

GANHO DE PESO FASE I

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	
BLOCOS	2.	.7082	.3541	1.39	NS
TRATAMENTOS	2.	.5606	.2803	1.10	NS
RESÍDUO	4.	1.0154	.2539		
-----					TOTAL
2.2842					8.

CONSUMO DE RAÇÃO FASE I

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	
BLOCOS	2.	2.1859	1.0929	1.52	NS
TRATAMENTOS	2.	2.5045	1.2522	1.74	NS
RESÍDUO	4.	2.8833	.7208		
-----					TOTAL
7.5736					8.

CONVERSÃO ALIMENTAR FASE I

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	.5661	.2830	1.38 NS
TRATAMENTOS	2.	.0698	.0349	.17 NS
RESÍDUO	4.	.8183	.2046	
<hr/>				
1.4542				

TOTAL

8.

GANHO DE PESO FASE II

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	1.6578	.8289	1.84 NS
TRATAMENTOS	2.	.8658	.4329	.96 NS
RESÍDUO	4.	1.8020	.4505	
<hr/>				
TOTAL	8.	4.3256		

CONSUMO DE RAÇÃO FASE II

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	23.5205	11.7602	.68 NS
TRATAMENTOS	2.	5.8305	2.9152	.17 NS
RESÍDUO	4.	69.3171	17.3293	
<hr/>				
TOTAL	8.	98.6680		

CONVERSÃO ALIMENTAR FASE II

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	.0964	.0482	1.77 NS
TRATAMENTOS	2.	.0968	.0484	1.78 NS
RESÍDUO	4.	.1086	.0271	
TOTAL	8.	.3018		

GANHO DE PESO FASE III

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	2.3133	1.1566	.26 NS
TRATAMENTOS	2.	1.0539	.5269	.12 NS
RESÍDUO	4.	17.5275	4.3819	
TOTAL	8.	20.8946		

CONSUMO DE RAÇÃO FASE III

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	1.3263	.6631	.00 NS
TRATAMENTOS	2.	134.8574	67.4287	.37 NS
RESÍDUO	4.	726.1175	181.5294	
TOTAL	8.	862.3012		

CONVERSÃO ALIMENTAR FASE III

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	.1854	.0927	.51 NS
TRATAMENTOS	2.	.1271	.0635	.35 NS
RESÍDUO	4.	.7210	.1802	
TOTAL	8.	1.0334		

GANHO DE PESO TOTAL

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	7.8702	3.9351	.57 NS
TRATAMENTOS	2.	3.9285	1.9642	.29 NS
RESÍDUO	4.	27.4219	6.8555	
TOTAL	8.	39.2206		

CONSUMO DE RAÇÃO TOTAL

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	12.7878	6.3939	.02 NS
TRATAMENTOS	2.	148.1928	74.0964	.27 NS
RESÍDUO	4.	1083.4244	270.8561	
TOTAL	8.	1244.4050		

CONVERSÃO ALIMENTAR TOTAL

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
BLOCOS	2.	.1488	.0744	1.12 NS
TRATAMENTOS	2.	.0815	.0407	.61 NS
RESÍDUO	4.	.2651	.0663	
TOTAL	8.	.4954		