

Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana

Flávia Carolina Alonso Buriti y Susana Marta Isay Saad

Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo- São Paulo, SP, Brasil

RESUMO. O grupo *Lactobacillus casei* compreende bactérias lácticas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, aptas a colonizar vários ambientes naturais e criados pelo homem. As bactérias do grupo *Lactobacillus casei* têm sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde. Várias funções benéficas ao organismo humano têm sido atribuídas ao consumo regular de alimentos contendo bactérias desse grupo. Tais bactérias são freqüentemente empregadas nas indústrias alimentícias visando a melhoria da qualidade de diferentes produtos. Diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar a viabilidade de emprego de cepas do grupo *Lactobacillus casei* como probióticos em laticínios, sobremesas e outros alimentos. Mesmo com a importância desses microrganismos para a indústria, a taxonomia das bactérias desse grupo ainda permanece confusa. Esta revisão discute importantes estudos relacionados à caracterização das bactérias do grupo *Lactobacillus casei*, a aplicação dessas bactérias como probióticos em diferentes alimentos e os principais efeitos benéficos atribuídos ao consumo regular de produtos contendo tais microrganismos.

Palavras chave: Grupo *Lactobacillus casei*, probióticos, taxonomia, efeitos benéficos.

SUMMARY. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Lactobacillus casei* is a group of phenotypically and genetically heterogeneous lactic acid bacteria, able to colonize various natural and man-made environments. Strains of the *Lactobacillus casei* group have been widely studied with respect to their health-promoting properties. Several beneficial functions for the human organism have been attributed to regular consumption of food products containing these strains. Bacteria of the *Lactobacillus casei* group are of great interest for the food industry to improve food quality. A number of studies have been conducted in order to evaluate the viability of strains of *Lactobacillus casei* group as probiotic in dairy products, desserts, among others food products. Despite its importance for the food industry, the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group is still unclear. This review discusses important studies related to characterization of strains of *Lactobacillus casei* group, the application of these bacteria as probiotic in different food products and the main beneficial effects attributed to regular consumption of products containing such microorganisms.

Key words: *Lactobacillus casei* group, probiotics, taxonomy, health benefits.

INTRODUÇÃO

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* fazem parte do chamado “Grupo *Lactobacillus casei*” e possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos para a melhoria de sua qualidade (1-3). As referidas cepas também são aptas a colonizar vários ambientes naturais e criados pelo homem, como boca, trato intestinal e vagina humanos, laticínios e produtos vegetais, ensilagem, esgoto e alimentos deteriorados. Tais microrganismos estão especificamente associados à fermentação do pão e algumas fermentações de queijos em salmouras, além de também causarem deterioração de queijos pela fermentação de citrato convertido em dióxido de carbono (2,4,5).

Cepas de *Lactobacillus casei/paracasei* e *Lactobacillus*

rhamnosus têm sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo freqüentemente empregadas como probióticos em alimentos industrializados (2-4,6). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro(7). O reconhecimento dos alimentos contendo probióticos como alimentos funcionais que provêm benefícios além da nutrição básica inerente e as emergentes evidências para seu potencial na prevenção de doenças têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos (8,9).

Os efeitos benéficos atribuídos aos microrganismos probióticos têm sido alcançados principalmente através da modulação da população e atividade da microbiota intestinal (10). As espécies *Lactobacillus casei/paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* constituem uma fração substancial da microbiota constituída por *Lactobacillus* spp. na mucosa intestinal humana (3).

A presente revisão discute importantes estudos envolvendo bactérias do grupo *Lactobacillus casei*, particularmente as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, relacionados à taxonomia, aplicação em alimentos probióticos e aos efeitos benéficos *in vivo* atribuídos a essas cepas.

As bactérias lácticas, OS *Lactobacillus* spp. E O GRUPO *Lactobacillus casei*

Bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos, não-esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (11). O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares (12). Contudo, exceções desta descrição geral ocorrem devido a algumas espécies poderem formar catalase ou citocromos em meio contendo hematina ou compostos relacionados. A produção de uma catalase não-heme, denominada pseudocatalase, por alguns lactobacilos também causa alguma confusão na identificação de bactérias lácticas (11).

As primeiras definições de bactérias lácticas baseavam-se na capacidade de fermentação e coagulação do leite por esse grupo de microrganismos, incluindo também os coliformes. A descrição de *Lactobacillus* por Beijerinck em 1901 como bactérias Gram-positivas separou os coliformes das bactérias lácticas (4).

O interesse pela presença dos lactobacilos na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff – Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses microrganismos para a bacterioprofilaxia e bacterioterapia (4).

Dentre as bactérias lácticas, o grupo *Lactobacillus casei* compreende aquelas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. Destacam-se nesse grupo os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (11,13).

O gênero *Lactobacillus* é filogeneticamente diverso (11). No Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o gênero *Lactobacillus* é descrito como um grupo heterogêneo de 'bastonetes regulares, Gram-positivos e não-esporulados'. Com o desenvolvimento das análises filogenéticas nos anos 1980, houve muitas alterações nesse gênero. O gênero *Lactobacillus* inclui cerca de 80 espécies reconhecidas (12), embora 5 espécies heterofermentativas de *Lactobacillus* tenham sido transferidas para o gênero *Weissella* (3).

A divisão clássica dos lactobacilos está baseada em suas características fermentativas: 1 – obrigatoriamente homofermentativos; 2 – facultativamente heterofermentativos; e 3 – obrigatoriamente heterofermentativos (12). Vários lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos e facultativamente heterofermentativos e alguns obrigatoriamente heterofermentativos são utilizados em

alimentos fermentados. Porém, esse último grupo é comumente associado à deterioração de alimentos (3).

Os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato (3). Exemplos desse grupo são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus salivarius* (11,12).

Os obrigatoriamente heterofermentativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias (3). São exemplos desse grupo as espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* (12,13).

Os facultativamente heterofermentativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido-láctico e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses microrganismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético. As espécies *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e do grupo *Lactobacillus casei* são importantes representantes dos lactobacilos facultativamente heterofermentativos (3,12).

Caracterização e classificação de cepas do grupo *Lactobacillus casei*

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* e *Lactobacillus rhamnosus*, que compõem o grupo taxonômico *Lactobacillus casei*, apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes. Historicamente, a diferenciação entre cada uma das espécies pertencentes a esse grupo e a sua sistemática tem apresentado problemas e ajustes têm sido introduzidos baseados em novos métodos taxonômicos que foram se tornando disponíveis gradualmente (2,14).

Felis *et al.* (2) e Dellaglio *et al.* (15) relataram que a cepa ATCC 393^T foi designada como cepa-referência de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* por Hansen e Lessel em 1971, com base somente em poucos aspectos fenotípicos.

Diversos autores citaram os estudos de homologia de DNA realizados por Collins *et al.* (16), que ocasionaram a reclassificação da maioria das cepas-referências de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* e *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopiantarum* como espécies *Lactobacillus paracasei* (dada a elevada relação entre o DNA dessas espécies, porém não relacionados à cepa ATCC 393^T), além da mudança da denominação *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* para *Lactobacillus rhamnosus* (2,4,15).

Dicks *et al.* (17) verificaram que a cepa *Lactobacillus casei*

subsp. *casei* ATCC 393^T exibiu baixos níveis de homologia de DNA com outras cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (8 a 46%) e de *Lactobacillus paracasei* (30 a 50%), mas exibiu 80% de similaridade de DNA com *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820, originalmente citada em 1959 por Kuznetsov como cepa-referência de “*Lactobacterium zae*”. Dicks *et al.* (17) forneceram novos indícios a favor da reclassificação da cepa ATCC 334 como a nova cepa-referência de espécies *Lactobacillus casei*. Segundo esses autores, a cepa ATCC 334 é geneticamente relacionada às cepas *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (71 a 97%) e *Lactobacillus paracasei* (71% a 91%), é membro do mesmo perfil de proteína de grupo que estes organismos e divide vários amplicons de DNA com cepas *Lactobacillus paracasei*. Com base nessas investigações, os autores propuseram que as cepas *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 fossem reclassificadas como membros da espécie *Lactobacillus zae* (cepa-referência ATCC 15820). Propuseram ainda que a cepa ATCC 334 fosse designada como a nova referência para *Lactobacillus casei* subsp. *casei* e que o nome *Lactobacillus paracasei* fosse rejeitado.

Felis *et al.* (2) investigaram a relação filogenética entre espécies e cepas do grupo *Lactobacillus casei* (*Lactobacillus casei* – ATCC 334 e ATCC 393^T, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* – NCDO 151^T e LMG 9438, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* – LMG 9191^T, *Lactobacillus rhamnosus* LMG 6400^T, *Lactobacillus zae* LMG 17315^T e *Lactobacillus* sp. DF1). No referido estudo a distância filogenética entre *Lactobacillus casei* ATCC 393^T e *Lactobacillus casei* ATCC 334 mostrou-se maior que entre ATCC 393^T e a cepa de referência de *Lactobacillus zae*. Contrariamente, as distâncias entre as cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* ATCC 334 foram virtualmente zero, demonstrando que tais microrganismos formam um único grupo filogenético. Além disso, houve alta similaridade genética entre *Lactobacillus casei* ATCC 393^T e *Lactobacillus zae* LMG 17315^T, indicando que tais cepas são membros da mesma espécie. Dessa forma, os autores, juntamente com DELLAGLIO *et al.* (15), propuseram à Comissão Judicial (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes) que considerassem a cepa ATCC 393^T inadequada como referência para as espécies *Lactobacillus casei* e que a denominação *Lactobacillus paracasei* fosse rejeitada, uma vez que as cepas ATCC 334 e NCDO 151 são filogeneticamente indistinguíveis de muitas cepas representativas de *Lactobacillus casei*. Ainda, segundo Dellaglio *et al.* (15), *Lactobacillus casei* deveria ser “legítima denominação” das cepas *Lactobacillus paracasei*, e propuseram que a cepa ATCC 334 fosse designada como a nova cepa-referência para tais espécies, em reforço aos trabalhos de Dicks *et al.* (17) e Felis *et al.* (2).

Em estudo anterior realizado por Schillinger (18),

envolvendo a identificação de cepas de *Lactobacillus* presentes em iogurtes e outros produtos probióticos comerciais através da técnica de hibridização de DNA, foi revelado que algumas cepas foram incorretamente classificadas. Dentre essas cepas, aquelas designadas pelo fabricante como *Lactobacillus casei* mostraram ser membros tanto de espécies *Lactobacillus casei*, como de *Lactobacillus paracasei* ou de *Lactobacillus rhamnosus*.

Dessa forma, apesar da grande importância para a indústria de alimentos, a taxonomia do grupo *Lactobacillus casei* ainda permanece confusa (2), uma vez que as requisições referentes à nomenclatura das espécies que compõem esse grupo permanecem pendentes pela Comissão Judicial (14,19).

Emprego de bactérias do grupo *Lactobacillus CASEI* em alimentos

O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas é um foco importante das indústrias de alimentos e, geralmente, a produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira é um desafio tecnológico (20,21). Vários trabalhos propuseram que a dose mínima diária de culturas probióticas considerada terapêutica corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 6 a 7 log ufc/g (22-24).

Shirota, no Japão, por volta de 1930, focou sua pesquisa na seleção de cepas de bactérias intestinais que pudessem sobreviver à passagem através do intestino e no uso dessas cepas para desenvolver leites fermentados para distribuição em sua clínica. Seu primeiro produto contendo *Lactobacillus casei* Shirota (naquela época denominado *Lactobacillus acidophilus*) foi a base para o estabelecimento da Yakult (25). Shortt *et al.* (25) relataram que a cepa *Lactobacillus casei* Shirota era amplamente consumida no Japão, sendo que mais de 10% da população consumia produtos contendo esse microrganismo nos anos 1970.

Em meio aos vários tipos de produtos alimentícios, os iogurtes ou produtos similares têm sido utilizados como veículos mais populares para a incorporação de microrganismos probióticos (26). A aplicação de bactérias do grupo *Lactobacillus casei* em novos tipos de iogurtes tem aumentado progressivamente (18).

Kristo *et al.* (26) modelaram e avaliaram os efeitos simultâneos da temperatura de fermentação (TF), teor de sólidos totais do leite (TS) e a quantidade total de inóculo (TI) sobre as propriedades reológicas, a cinética de acidificação e a multiplicação microbiana em leite fermentado contendo a cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B117 em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* Y4.10 e *Lactobacillus bulgaricus* Y6.15. Os autores avaliaram, ainda, a viabilidade desses microrganismos, o perfil de ácidos orgânicos e a aceitabilidade sensorial do produto. *Lactobacillus*

paracasei mostrou boa sobrevivência em todos os testes durante os 21 dias de armazenamento a 4°C, sempre superiores a 6 log ufc/ml, mostrando boa compatibilidade com os microrganismos *starter*. Após 7 dias de armazenamento, os produtos probióticos apresentaram maior teor de ácidos láctico, pirúvico e orótico, quando comparados ao produto controle, porém sem resultar em diferenças significativas nas análises sensoriais após 2 e 7 dias de armazenamento. Não houve contribuição do TI na taxa máxima de acidificação do produto e a sua firmeza (aumento de G' e redução da tangente d) foi afetada pela diminuição de TF e aumento de TS. A multiplicação de *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus thermophilus* também foi afetada pela redução de TF. Assim, os autores concluíram que através da aplicação de condições apropriadas de fermentação, a cepa *Lactobacillus paracasei* B117 pode ser usada com sucesso para a produção de leite fermentado com propriedades probióticas, em conjunto com culturas tradicionais.

Em complementação aos iogurtes e leites fermentados, os queijos podem ser uma alternativa como veículo para a administração de bactérias probióticas viáveis em número suficiente para promover benefícios à saúde (9,27,28). Culturas contendo cepas probióticas também têm sido utilizadas para a melhoria de aroma e sabor desses produtos (28-30).

A melhoria das características sensoriais de queijos Arzúa-Ulloa foi obtida por Menéndez *et al.* (31), que utilizaram uma de cinco cepas diferentes de *Lactobacillus* – *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* (duas cepas), *Lactobacillus casei* (cepa comercial) – em complementação à cultura *starter* composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Naquele estudo, a adição das cepas probióticas ao queijo resultou em uma redução do sabor amargo quando comparado ao queijo controle.

Por outro lado, Buriti *et al.* (28) não verificaram alterações nas características sensoriais (após 7 dias de armazenamento a 5°C) e de textura (durante 21 dias de armazenamento a 5°C) de queijos Minas frescal produzidos com *Lactobacillus paracasei* LBC 82, quando comparados aos queijos controles. Naquele estudo, o microrganismo probiótico apresentou aumento da viabilidade nos queijos durante todo o armazenamento, com contagens próximas de 7, entre 7 e 8, próximas de 8 e entre 8 e 9 log ufc/g após, respectivamente, 1, 7, 14 e 21 dias.

Vinderola *et al.* (32) estudaram o emprego de cepas de *Lactobacillus casei* combinadas somente com bifidobactérias ou com *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, em queijo fresco argentino. As combinações de *Lactobacillus casei* e bifidobactérias resultaram em uma sobrevivência satisfatória desses microrganismos no queijo, com populações superiores a 6 log ufc/g durante 60 dias de armazenamento, sem redução da viabilidade de *Lactobacillus casei*, porém com redução da

viabilidade de bifidobactérias. A adição de *Lactobacillus casei*, juntamente com *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, resultou em um queijo com elevadas populações desses três microrganismos (superiores a 7 log ufc/g durante todo o armazenamento, exceto para uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* aos 60 dias).

Em estudo realizado por Gardiner *et al.* (33), foram empregados *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus paracasei*, isolados de intestino delgado humano, para a fabricação de queijo Cheddar, no qual a espécie *Lactobacillus paracasei* apresentou multiplicação e manutenção de alta viabilidade durante a maturação, enquanto que as populações de *Lactobacillus salivarius* diminuíram durante o mesmo período; dessa forma os autores sugeriram que o queijo Cheddar poderia ser efetivo para veicular microrganismos probióticos ao consumidor.

Sobremesas aeradas tipo musse também tem mostrado um grande potencial de mercado para consumidores interessados em alimentos mais saudáveis e funcionais (34,35). Aragon-Alegro *et al.* (36) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus paracasei* LBC 82 em musses de chocolate potencialmente probióticas e simbióticas fabricadas, respectivamente, sem e com a adição do prebiótico inulina. Naquele estudo as populações de *Lactobacillus paracasei* foram sempre superiores a 7 log ufc/g durante 28 dias de armazenamento, tanto nas musses probióticas como nas simbióticas.

Embora os produtos lácteos fermentados constituam uma fração substancial do mercado de prebióticos e probióticos, o número de produtos não lácteos é crescente, particularmente aqueles à base de soja (5,37,38). Nesse sentido, Heenan *et al.* (39) avaliaram a sobrevivência de microrganismos probióticos e as populações de células resistentes à bile em sobremesa não-fermentada congelada, à base de soja, adicionada de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Lp-01, *Lactobacillus acidophilus* MJLA-1, *Lactobacillus rhamnosus* 100-C, *Bifidobacterium lactis* BDBB2, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (atualmente reclassificada como *Bifidobacterium animalis*) ou *Saccharomyces boulardii* 74012. Naquele estudo, todos os microrganismos probióticos testados mantiveram populações superiores a 6 log ufc/g de produto durante 6 meses de armazenamento, com exceção da cepa de *Saccharomyces boulardii*. Por outro lado, a cepa de *Lactobacillus paracasei* estudada apresentou o maior número de células sensíveis à bile (44 % da contagem total) em relação aos demais probióticos.

Cepas do grupo *Lactobacillus casei* como bioconservantes em alimentos

Dentre as várias características associadas às bactérias lácticas, particularmente ao grupo *Lactobacillus casei*, destaca-se, também, o fato delas possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patógenos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (40-42).

Buriti *et al.* (41) verificaram que *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* contribuíram para a bioconservação de queijos frescos cremosos probióticos e simbióticos, tendo sido efetivos na inibição de contaminantes, incluindo coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* DNase positivos, o que não foi observado para os queijos que não continham *Lactobacillus paracasei*. No mesmo estudo, os autores descartaram a produção de bacteriocina por *Lactobacillus paracasei*; a inibição possivelmente ocorreu pela produção de diferentes ácidos por *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus thermophilus*.

Similarmente, Calderón *et al.* (42) observaram diminuição da população de *Staphylococcus aureus* e de *Listeria monocytogenes*, em níveis não detectáveis, após 12 dias de armazenamento de iogurtes contendo *Lactobacillus casei* CRL 431 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 730 em co-cultura, adicionados ou não de *Lactobacillus rhamnosus* LR 35. No mesmo estudo, a redução da população de *Escherichia coli* O157:H7, em níveis não detectáveis, ocorreu já aos 8 dias de armazenamento daqueles produtos. Nos iogurtes isentos de probióticos, a completa ausência de patógenos somente foi observada após 20 dias de armazenamento.

Em outro estudo também realizado com as cepas *Lactobacillus casei* CRL 431 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 730, em co-cultura, em iogurtes contaminados com *Staphylococcus aureus* na concentração inicial de 10^8 ufc/g, Salvatierra *et al.* (43) observaram uma queda da população desse contaminante para níveis não detectáveis após 7 dias de armazenamento. Nos iogurtes ausentes de probióticos, a população de *Staphylococcus aureus* ainda se manteve superior a 10^3 ufc/g aos 28 dias de armazenamento.

Outros diversos estudos, nos quais as bactérias *Lactobacillus casei/paracasei* utilizadas individualmente ou em co-cultura com outras bactérias lácticas inibiram a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, incluem coliformes (44-46), *Staphylococcus aureus* (44,46,47), *Listeria monocytogenes* (45,46), *Salmonella* (46), e *Candida* spp., *Zygosaccharomyces bailii* e *Penicillium* sp. (40).

Benefícios à saúde atribuídos às cepas do grupo *Lactobacillus casei*

Várias funções benéficas ao organismo humano têm sido atribuídas ao consumo regular de produtos contendo bactérias probióticas e diversos trabalhos foram conduzidos a fim de melhor caracterizar os efeitos clínicos e fisiológicos de cepas pertencentes ao grupo *Lactobacillus casei*.

Dentre os microrganismos mais estudados como probióticos destaca-se a cepa *Lactobacillus casei* Shirota (“ingrediente ativo” do Yakult) (6). Diversos autores citaram que o consumo regular de Yakult tem proporcionado evidências diretas ou indiretas relacionadas à redução do risco de câncer e de bexiga urinária e supressão de câncer cólon-retal (6,25,48).

A aderência de microrganismos probióticos às células epiteliais do intestino e a subsequente colonização da mucosa são de fundamental importância para a ocorrência dos efeitos benéficos à saúde humana (49,50). Adicionalmente, os probióticos do grupo *Lactobacillus casei* podem também apresentar efeito protetor contra microrganismos patogênicos e estudos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar tais efeitos (46, 50). Forestier *et al.* (49), utilizando linhagens de células intestinais Caco-2 em um modelo *in vitro*, demonstraram que a cepa probiótica de *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 – atualmente reclassificada como uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, Collins *et al.* (16) – exibiu propriedades de adesão. Ainda, os autores verificaram que as bactérias patogênicas *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile* apresentaram multiplicação reduzida após 5 horas de incubação em meio Luria-Bertani ou ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro contendo sobrenadante da cepa probiótica Lcr35 livre de células.

A atividade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp, isoladas de fezes de recém-nascidos e de crianças com até dois anos de idade, sobre bactérias contaminantes de alimentos ou patógenos foi estudada por Arici *et al.* (51). Os autores verificaram que 4 cepas de *Lactobacillus paracasei* (IF8, IF9, IF10 e IF11) exerceram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 28213 e 3 cepas (IF8, IF10 e IF11) inibiram a multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 2392, em ensaios de difusão em ágar. A conclusão daquele estudo foi que tais cepas de *Lactobacillus paracasei* podem contribuir para a manutenção da microbiota intestinal normal daquelas crianças, através do controle da multiplicação de bactérias potencialmente patogênicas à saúde e, dessa forma, prevenir a ocorrência de doenças.

Em complemento, Guérin-Danan *et al.* (52) avaliaram a influência da suplementação com leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* (referência Danone DN-114 001) pelo período de um mês sobre os índices metabólicos e da microbiota intestinal de crianças saudáveis com idades entre 10 e 18 meses. Houve um aumento significativo da porcentagem de crianças que apresentaram populações de lactobacilos superiores a $6 \log$ ufc/g nas fezes entre aquelas que receberam leite fermentado com *Lactobacillus casei*. Paralelamente, a atividade enzimática potencialmente nociva da β -glicuronidase e da β -glicosidase (enzimas envolvidas na circulação enteropática de substâncias tóxicas e carcinogênicas) diminuiu significativamente nessas crianças. Os autores concluíram que tais efeitos representam uma influência saudável de *Lactobacillus casei* sobre o hospedeiro.

Rochet *et al.* (53) também verificaram um aumento da população fecal de *Lactobacillus casei* em adultos saudáveis

que consumiram leite fermentado com a cepa DN-114 001, por um período de 10 dias. Sullivan *et al.* (54) observaram um aumento significativo na população de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 e de outros lactobacilos nas fezes de humanos idosos soro-positivos para *Helicobacter pylori*. Tal efeito significativo ocorreu nos indivíduos que receberam leite fermentado com *Lactobacillus paracasei* F19, $3,5 \times 10^8$ ufc/ml e 2% de inulina, 150 mL duas vezes ao dia por 12 semanas, quando comparado ao grupo controle (que também recebeu leite fermentado pelo mesmo período, mas sem adição de *Lactobacillus paracasei* F19 e inulina).

Sarker *et al.* (55) observaram que a cepa *Lactobacillus paracasei* ST11 auxiliou na melhoria dos sintomas de crianças com diarreia não induzida por rotavírus. O consumo de leite fermentado contendo a cepa *Lactobacillus casei* DN-114 001 também foi relacionado com a redução de episódios de diarreia (53).

A modulação de vários parâmetros da imunidade de humanos adultos saudáveis que consumiram 10 g diárias de lingüiça probiótica suplementada com *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 durante 5 semanas foi observada por Jahreis *et al.* (56). Ao final da intervenção naqueles indivíduos, foi verificado um aumento significativo do número de anticorpos contra LDL oxidada. Também foi observado um aumento dos níveis de linfócitos (T-helper) CD4 após 2 semanas de suplementação com *Lactobacillus paracasei*. Naquele estudo também foi observado um aumento significativo de *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 nas amostras fecais de voluntários que consumiram a lingüiça probiótica e foi encontrada uma correlação positiva entre a população de *Lactobacillus paracasei* nas fezes e a percentagem de células expressoras de CD4.

Adicionalmente, muitos trabalhos foram conduzidos com animais para também caracterizar os efeitos funcionais *in vivo* de cepas pertencentes ao grupo *Lactobacillus casei*. Os efeitos atribuídos a esses microrganismos estão principalmente relacionados à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos (57), ativação das imunidades local e sistêmica (20, 58), redução dos sinais clínicos de diarreia por rotavírus (59), diminuição dos níveis de triglicérides séricos e de colesterol (60), redução da excreção de metano e aumento da concentração cecal dos ácidos graxos de cadeia curta totais, particularmente, acetato, propionato e butirato (61).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do papel da microbiota intestinal na manutenção da saúde e prevenção de doenças é bastante reconhecida. Distúrbios desse delicado equilíbrio podem gerar outras desordens e facilitar o estabelecimento de doenças. Esses fatos explicam os grandes desafios com respeito à apresentação de evidências científicas que confirmem os reais efeitos

funcionais relacionados aos microrganismos probióticos (13). Conforme apresentado neste trabalho, grandes progressos já foram realizados através de estudos *in vivo*, nos quais os efeitos funcionais de bactérias do grupo *Lactobacillus casei* puderam ser verificados, embora a reclassificação das espécies pertencentes a esse grupo ainda seja exigida. Nesse sentido, a classificação taxonômica adequada dessas cepas é de extrema importância, principalmente quando esses microrganismos são veiculados em alimentos probióticos. Os estudos com iogurtes, leites fermentados, queijos e outros alimentos mostram a grande preocupação que existe quanto à descrição e caracterização desses produtos. A utilização de diferentes cepas do grupo *Lactobacillus casei*, em conjunto com os microrganismos tradicionais usados nesses produtos pode resultar ou não em diferença sensorial perceptível pelo consumidor. Em complementação aos efeitos benéficos já comprovados, esses microrganismos ainda podem ser utilizados para conferir aroma, sabor e textura aos produtos alimentícios, além de auxiliarem na bioconservação dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelas bolsas e auxílio financeiro (Processos 02/11294-0, 04/13597-6 e 05/51317-8).

REFERÊNCIAS

1. Ferrero M, Cesena C, Morelli L, Scolari G, Vescovo M. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. FEMS Microbiol Lett. 1996; 140 (2-3): 215-219.
2. Felis GE, Dellaglio F, Mizzi L, Torriani S. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51 (6): 2113-2117.
3. Vásquez A, Molin G, Pettersson B, Antonsson M, Ahrne S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. Syst Appl Microbiol. 2005; 28 (5): 430-441.
4. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol. 1997; 36 (1): 1-29.
5. Hammes WP, Hertel C. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. Food Res Int. 2002; 35 (2-3): 165-170.
6. Itsaranuwat P, Al-Haddad KSH, Robinson RK. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. Int J Dairy Technol. 2003; 56 (4): 203-210.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001 [cited 2005 Dec 15]. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf.

8. Patrignani F, Lanciotti R, Mathara JM, Guerzoni ME, Holzapfel WH. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int J Food Microbiol.* 2006; 107 (1): 1-11.
9. Phillips M, Kailasapathy K, Tran L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108 (2): 276-280.
10. Yeung PSM, Sanders ME, Kitts CL, Cano R, Tong PS. Species-specific identification of commercial probiotic strains. *J Dairy Sci.* 2002; 85 (5): 1039-1051.
11. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73 (2) Suppl: 365S-373S.
12. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.* 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.
13. Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 109-116.
14. Desai AR, Shah NP, Powell IB. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *J Dairy Sci.* 2006; 89 (9): 3345-3351.
15. Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (1): 285-287.
16. Collins MD, Phillips BA, Zannoni P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1989; 39 (2): 105-108.
17. Dicks IMT, Plessis EM, Dellaglio F, Lauer E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the Neotype of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46 (1): 337-340.
18. Schillinger U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int J Food Microbiol.* 1999; 47 (1-2): 79-87.
19. De Vos P, Trüper HG, Tindall BJ. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005; 55 (1): 525-532.
20. Medici M, Vinderola CG, Perdígón G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J.* 2004; 14 (7): 611-618.
21. Kourkoutas Y, Xolias V, Kallis M, Bezirtzoglou E, Kanellaki M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochem.* 2005; 40 (1): 411-416.
22. Hoier E, Janzen T, Henriksen CM, Rattray F, Brockmann E, Johansen E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law BA, editor. *Technology of cheesemaking.* Boca Raton: CRC; 1999. p.90-131.
23. Moreno Y, Collado MC, Ferrús MA, Cobo JM, Hernández E, Hernández M. Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DIED® BacLight™ staining and conventional plate counts. *Int J Food Sci Technol.* 2006; 41 (3): 275-280.
24. Talwalkar A, Kailasapathy K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *Int Dairy J.* 2004; 14 (2): 143-149.
25. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Technol.* 1999; 10 (12): 411-417.
26. Kristo E, Biliaderis CG, Tzanetakis N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *Int Dairy J.* 2003; 13 (7): 517-528.
27. Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB, Reinheimer JA. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int Dairy J.* 2004; 14 (5): 375-387.
28. Buriti FCA, Rocha JS, Assis EG, Saad SMI. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT-Food Sci Technol.* 2005; 38 (2): 173-180.
29. Buriti FCA, Rocha JS, Saad SMI. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int Dairy J.* 2005; 15 (12): 1279-1288.
30. El Soda M, Madkor SA, Tong PS. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J Dairy Sci.* 2000; 83 (4): 609-619.
31. Menéndez S, Centeno JA, Godínez R, Rodríguez-Otero JL. Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *Int J Food Microbiol.* 2000; 59 (1-2): 37-46.
32. Vinderola CG, Proselo W, Ghiberto D, Reinheimer JA. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *J Dairy Sci.* 2000; 83 (9): 1905-1911.
33. Gardiner G, Ross RP, Collins JK, Fitzgerald G, Stanton C. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64 (6): 2192-2199.
34. Dyminski DS, Waszcynskyj N, Ribani RH, Masson ML. Características físico-químicas de musse de maracujá (*Passiflora*) elaborado com substitutos de gorduras. *Bol Cent Pesqui Process Aliment.* 2000; 18 (2): 267-274.
35. Pinto EP, Teixeira AM, Sopena LL, Rosa VP, Luvielmo MM. Sucralose no desenvolvimento de sobremesas lácteas *light*. *Bol Cent Pesqui Process Aliment.* 2003; 21 (1): 49-60.
36. Aragon-Alegro LC, Alegre JHA, Cardarelli HR, Chiu MC, Saad SMI. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Sci Technol.* 2007; 40 (4): 669-675.
37. Fuchs RHB, Borsato D, Bona E, Haully MCO. "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. *Cienc Tecnol Aliment.* 2005; 25 (1): 175-181.

38. Haully MCO, Fuchs RHB, Prudencio-Ferreira SH. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Rev Nutr.* 2005; 18 (5): 613-622.
39. Heenan CN, Adams MC, Hosken RW, Fleet GH. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT-Food Sci Technol.* 2004; 37 (4): 461-466.
40. Schwenninger SM, von Ah U, Nieder B, Teuber M, Meile L. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J Food Prot.* 2005; 68 (1): 111-119.
41. Burity FCA, Cardarelli HR, Saad SMI. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *J Food Prot.* 2007; 70 (1): 228-235.
42. Calderón O, Padilla C, Chaves C, Villalobos L, Arias ML. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Arch Latinoamer Nutric.* 2007; 57 (1): 51-56.
43. Salvatierra M, Molina A, Gamboa MM, Arias ML. Evaluación del efecto de cultivos prebióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. *Arch Latinoamer Nutric.* 2004; 54 (3): 298-302.
44. Sakhare PZ, Narasimha Rao D. Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. *Food Control.* 2003; 14 (1): 1-5.
45. Barrantes X, Railey D, Arias ML, Chaves C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Latinoamer Nutric.* 2004; 54 (3): 293-297.
46. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J Dairy Res.* 2004; 71 (4): 451-460.
47. Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41 (1): 1-7.
48. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J.* 1999; 9 (1): 43-52.
49. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol.* 2001; 152 (2): 167-173.
50. Hudault S, Liévin V, Bernet-Camard MF, Servin AL. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63 (2): 513-518.
51. Arici M, Bilgin B, Sagdic O, Ozdemir C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiol.* 2004; 21 (1): 19-24.
52. Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, Szytt O, Andrieux C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67 (1): 111-117.
53. Rochet V, Rigottier-Gois L, Sutren M, Kremetscki MN, Andrieux C, Furet JP, Tailliez P, Levenez F, Mogenet A, Bresson JL, Méance S, Cayuela C, Leplingard A, Doré J. Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. *Br J Nutr.* 2006; 95 (2): 421-429.
54. Sullivan A, Palmgren AC, Nord CE. Effect of *Lactobacillus paracasei* on intestinal colonization of lactobacilli, bifidobacteria e *Clostridium difficile* in elderly persons. *Anaerobe.* 2001; 7 (2): 67-70.
55. Sarker SA, Sultana S, Fuchs GJ, Alam NH, Azim T, Brüssow H, Hammarström L. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics.* 2005; 116 (2): 221-228.
56. Jahreis G, Vogelsang H, Kiessling G, Schubert R, Bunte C, Hammes WP. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 133-138.
57. Cano PG, Perdígón G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. *J Dairy Res.* 2003; 70 (4): 433-440.
58. Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Argumentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9 (1): 105-108.
59. Guérin-Danan C, Meslin JC, Chambard A, Charpilienne A, Relano P, Bouley C, Cohen J, Andrieux C. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. *J Nutr.* 2001; 131 (1): 111-117.
60. Minelli EB, Benini A, Marzotto M, Sbarbati A, Ruzzenente O, Ferrario R, Hendriks H, Dellaglio F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *Int Dairy J.* 2004; 14 (8): 723-736.
61. Djouzi Z, Andrieux C, Degivry MC, Bouley C, Szyt O. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *J Nutr.* 1997; 127 (11): 2260-2266.

Recibido: 30-07-2007

Aceptado: 10-10-2007