

RACHEL CATHARINA DE PAULA E SILVA CAETANO

**CRESCIMENTO DE *Klebsiella pneumoniae* EM DIETA ENTERAL
MODIFICADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2003

RACHEL CATHARINA DE PAULA E SILVA CAETANO

**CRESCIMENTO DE *Klebsiella pneumoniae* EM DIETA ENTERAL
MODIFICADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 31 de Janeiro de 2003

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Conselheiro)

Prof. Josefina Bressan R. Monteiro
(Conselheiro)

Prof. Simone Cardoso L. Pereira

Prof. José Mário da S. Mezencio

Prof. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientador)

Sobretudo a Deus pela força e por me permitir alcançar mais uma meta da minha vida.

Em especial a minha família meu pai (Ronaldo), minha mãe (Regina) e meus amores Tolingolau, Nildos e Picoto pelo enorme amor, carinho, incentivo, força, respeito e principalmente por acreditarem sempre em mim.

Ao meu irmão (Rodrigo) que é uma pessoa maravilhosa, pela grande força , respeito e amizade.

Ao meu amor, Demian, pela dedicação, paciência, amor e carinho que foram muito importantes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Secretaria de Educação do Distrito Federal pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, pelos conhecimentos e principalmente pela amizade.

Ao professor Jorge Luiz Cavalcante Coelho pelas valorosas contribuições, conselhos, estímulos e especialmente pela amizade.

À professora Josefina Bressam R. Monteiro pelos conselhos e contribuição que foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Microbiologia pelos conhecimentos adquiridos.

As meninas da secretaria (Laura, Nilceia e Aparecida) pela ajuda nos planos de trabalho, pela eficiência e pela grande amizade.

Aos funcionários do prédio da Biologia (Esquilinho, seu Paulo, seu Cezário) e aos do BIOAGRO (Evandro, Danilo e Zé Reinaldo) pelas conversas e ajudas nas horas necessárias.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, de cada laboratório assim como os estagiários pela ajuda e amizade.

A empresa Orafti pela cessão dos prebióticos usados neste trabalho.

A Fran (Micorriza) pela ajuda com as fotos tiradas no microscópio.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Ana Lúcia, Simone, Cristiane, Maurílio, Claudia Lúcia, Esther, Uelinton (Zuelinton Manuel), Selma pelo ótimo relacionamento, conversas, risos e ajudas em todas as horas.

Em especial para o estagiário Rodrigo com as ajudas nas acidificações e titulações das dietas.

À minha inesquecível amiga Juliana (Mãe Branca), pela enorme amizade, compreensão, conversas, carinho e intermináveis domingos.

Ao meu novo irmão André (Preto Velho) pela enorme amizade, carinho, perturbações, respeito e é claro pela minha segurança em locais de trabalho e de lazer.

Às meninas Super Poderosas, Tia Marciana, Wanessa (criaturinha), Eliseth (Elisgete) e Garrafinha (Elisângela) pelas conversas, noitadas, risos choros e acima de tudo pela leal e sincera amizade.

Aos meus eternos amigos: Liliane (Lili), Tereza (Tetê), Greice Kelle, Anne, Kledna, Marcos, Alex, Handiara, Selma, Samantha, Chellen, Zeca, Patrícia, Neía, Mirian, Patrícia, Akiriko, Ana Paula (Natasha), Edgar, Poli, Fran.

Aos meus amigos de Brasília Fafá, Gabi, Linha, Rodrigo Pedroso, Gustavo, Léo pelas intermináveis conversas no telefone, apoio e amizade.

Aos meus amigos de trabalho Orlando, Cássia, Ana Cláudia, Flávio, Denise, Cidinha pelo incentivo e grande apoio.

Às minhas avós, tios e primas pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

RACHEL CATHARINA DE PAULA E SILVA CAETANO, filha de Ronaldo José Moreira Caetano e Regina Lúcia de Paula e Silva Caetano, nasceu no Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, no dia 14 de fevereiro de 1976.

Em agosto de 1994 ingressou no Centro Universitário de Brasília (UniCeub), onde em julho de 1998, graduou-se em Biologia.

No período de 1995 a 1998 fez Iniciação Científica na área de Controle Biológico no CENARGEM/EMBRAPA, em Brasília.

No período de 1998 a 2000 trabalhou na Secretaria de Educação do Distrito Federal na função de Coordenadora Geral de Ciências Biológicas.

Em agosto de 2000 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, nível de Mestrado, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AU: Arbitrary Activity Unit per mL (corresponde a 40 UI)

Aw: Atividade de Água

EDTA: Ácido Etilnodiaminotetraacético

FDA: Food and Drug Administration

FOS: Frutooligossacarídeo

GRAS: Geralmente Reconhecido como Seguro

MS: Ministério da Saúde

UFC mL⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

UFC cm²: Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado

UI: Unidade Internacional

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Microrganismo.....	17
3.2. Determinação do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> em diferentes fontes de carbono.....	18
3.3. Determinação do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> em dietas enterais.....	19
3.4. Parâmetros cinéticos do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> em dietas enterais	20
3.5. Determinação da acidez titulável.....	20
3.6. Observação microscópica da cápsula de polissacarídeo.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Avaliação do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> em caldo nutriente com diferentes carboidratos.....	22
4.2. Crescimento de <i>K. pneumoniae</i> sob diferentes temperaturas e valores de pH.....	25
4.3. Avaliação do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> em dietas enterais acrescida de prebióticos, nisina mais EDTA.....	32

4.4. Observação microscópica da cápsula de polissacarídeos.....	35
4.5. Determinação da acidez titulável.....	36
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

CAETANO, Rachel Catharina de Paula e Silva, M. S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2003. **Crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em dieta enteral modificada.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Jorge Luiz Cavalcante Coelho e Josefina Bressam Resende Monteiro

Avaliou-se o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* estirpe P15 em caldo nutriente adicionado de diferentes fontes de carbono, em dieta enteral comercial nas condições geralmente adotadas durante a estocagem e administração e em dietas com o pH modificado ou adicionadas de prebióticos e nisina + EDTA. Verificou-se que, a adição de adonitol, amido, dulcitol e xilitol ao caldo nutriente, reduziu o crescimento bacteriano em relação ao controle após 11 horas de incubação a 37 °C. Fontes de carbono como glicose, maltodextrina, maltodextrina mais triglicerídeos de cadeia média e sacarose estimularam o crescimento de *K. pneumoniae*. A 25 °C foi verificado o crescimento da bactéria nas dietas enterais com pH variando de 4,9 a 7,9 resultando em uma população de 10^7 a 10^9 UFC mL⁻¹, em 26 horas de incubação o que correspondeu a um aumento de três a cinco ciclos logaritmos na base 10 no número de células. O tempo de geração de *K. pneumoniae* em dieta enteral a 25 °C, variou de 44,2 a 95,9 minutos com velocidades específicas de crescimento de 0,433 h⁻¹ a 0,941 h⁻¹. A 15 e 20 °C o crescimento de *K. pneumoniae* em valores de pH 5,9 a 7,9 também resultou em um aumento de três a cinco ciclos logaritmos na população. O ajuste do pH da dieta para 4,9 resultou em um crescimento menor do que um ciclo logaritmo. Não foi observado o crescimento de *K. pneumoniae* em dietas com pH 3,9. A 15 e 20 °C constatou-se a redução substancial dos parâmetros cinéticos de

crescimento bacteriano avaliados com valores de tempo de geração entre 98,83 e 419,24 minutos e velocidade específica de crescimento entre $0,099 \text{ h}^{-1}$ e $0,420 \text{ h}^{-1}$. O efeito estimulador do frutooligossacarídeo e de inulina no crescimento de *K. pneumoniae*, observado em caldo nutriente, não foi constatado quando estes prebióticos foram adicionados em dietas enterais com o pH ajustado para 5,0 e 5,5. A adição de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ do antimicrobiano nisina juntamente com o agente quelante EDTA não promoveu a inibição do crescimento de *K. pneumoniae*. A baixa concentração de nisina adicionada e provavelmente, a abundância de minerais encontrada na composição de dietas enterais, pode ter contribuído para a ineficácia da nisina sobre a *K. pneumoniae*. A presença de cápsula foi verificada em células de *K. pneumoniae* cultivadas em caldo nutriente adicionado de glicose, maltodextrina, maltodextrina + TCM e sacarose e em dietas enterais com pH ajustado entre 3,9 e 6,9. A presença de cápsula não foi observada nas células de *K. pneumoniae* cultivadas em caldo nutriente adicionado de fontes de carbono como adonitol, amido, dulcitol, xilitol e em dietas incorporadas de frutooligossacarídeo, inulina ou nisina + EDTA em pH 5,0. A acidez titulável expressa em ácido láctico da dieta comercial variou, inicialmente, entre 0,94 a 1,22% e após o crescimento de *K. pneumoniae* foram encontrados valores de 0,80 % após a incubação por 48 horas a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,76 % a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 0,66 % a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

ABSTRACT

CAETANO, Rachel Catharina de Paula e Silva, M. S., Universidade Federal de Viçosa, January 2003. **Growth of *Klebsiella pneumoniae* in modified enteral formula.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee members: Jorge Luiz Cavalcante Coelho e Josefina Bressan Resende Monteiro

Growth of *Klebsiella pneumoniae* strain P15 in nutrient broth supplemented with different carbon sources, in commercial enteral formula under typical storage and administration conditions and in formula with modified pH or supplemented with prebiotics or nisin A + EDTA was evaluated. Addition of adonitol, starch, dulcitol and xylitol to nutrient broth reduced bacterial growth in relation to the control after 11 hours incubation at 37 °C. Carbon sources such as glucose, maltodextrin, maltodextrin + medium chain triglycerides and sucrose stimulated growth of *K. pneumoniae* and resulted in populations of greater cellular mass. At 25 °C, bacterial growth was found in formula at pH of 4.9 to 7.9, and reached 10⁷ to 10⁹ CFU mL⁻¹ after 26 hours incubation, corresponding to an increase of three to five log cycles. Generation time of *K. pneumoniae* in enteral formula at 25 °C varied from 44.2 to 95.9 minutes, resulting in specific growth rates of 0.433 to 0.941 h⁻¹. At 15 and 20 °C and pH 5.9 to 7.9, growth of *K. pneumoniae* also increased three to five log cycles. Adjusting the formula pH to 4.9 resulted in less than one log cycle of growth. No *K. pneumoniae* growth was observed in formula at pH 3.9. At 15 and 20 °C, a substantial reduction in the bacterial kinetic growth parameters evaluated was observed, with generation times varying from 98.83 to 419.24 minutes and specific growth rates from 0.099 to 0.420 h⁻¹. The stimulating effect of fructo-oligosaccharides and inulin on *K.*

pneumoniae growth that was observed in nutrient broth was not found when these prebiotics were added to the enteral formula at pH 5.0-5.5. Addition of 3.0 mg L⁻¹ of the antimicrobial agent nisin together with the chelant EDTA did not inhibit growth of *K. pneumoniae*. The low nisin concentration and, probably, the abundance of minerals in the enteral formula may have affected EDTA's chelating action, and thus interfered with nisin's action. Capsules were present when *K. pneumoniae* cells were cultivated at pH 3.9 to 6.9 in nutrient broth supplemented with glucose, maltodextrin, maltodextrin + medium chain triglycerides and sucrose. Capsules were not observed when *K. pneumoniae* cells were cultivated at pH 5.0 in nutrient broth supplemented with adonitol, starch, dulcitol and xylitol or in enteral formula supplemented with fructo-oligosaccharide, inulin or nisin + EDTA. Titratable acidity in commercial enteral formula initially varied between 0.94 and 1.22 %, expressed as equivalent lactic acid. Upon growth of *K. pneumoniae*, 0.80 % acidity was found at 15 °C, 0.76 % at 20 °C and 0.66 % at 25 °C, after 48 hours of incubation.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos podem ser considerados como um veículo de transmissão de microrganismos patogênicos em ambiente hospitalar e quando isso ocorre, é particularmente importante porque, muitas vezes, envolve indivíduos já debilitados por doenças graves ou pelo uso sistêmico de antibióticos. Apesar disso, pouca importância é dada aos alimentos como fonte de microrganismos capazes de causar infecções hospitalares.

Alguns pacientes hospitalizados necessitam de terapia nutricional por dietas enterais. Essas dietas são formulações especiais de alimentos recomendados para pacientes incapazes de se alimentar por via oral devido a alguma patologia ou cirurgia. A contaminação dessas dietas representa um risco potencial em razão da sua composição rica em nutrientes, pH neutro e atividade de água elevada, bem como, as vias de acesso e às condições de tempo e temperatura em que são administradas. Essa contaminação das dietas compromete a evolução clínica dos pacientes podendo resultar em complicações como vômitos, diarreias, gastroenterites, septicemia e até a morte.

Em razão da manipulação inadequada, de processos ineficientes de higienização de utensílios e equipamentos, de um elevado tempo de preparo e do manuseio antes da administração, dietas enterais podem ser contaminadas por

uma grande variedade de microrganismos. Entretanto, bactérias Gram-negativas são os contaminantes mais freqüentemente encontrados.

Bactérias Gram-negativas são também importantes agentes de infecção hospitalar e *Klebsiella* está entre as mais freqüentemente identificadas como patógeno oportunista. *Klebsiella* é também uma das bactérias mais freqüentemente encontradas contaminando dietas enterais, representando uma possível causa de doença infecciosa em indivíduos imunodeprimidos.

Considerando o risco da presença de estirpes virulentas de *Klebsiella* em dietas enterais, o presente trabalho teve como objetivos, acompanhar o crescimento de *Klebsiella* em dietas enterais nas condições geralmente adotadas durante a estocagem e administração e verificar o efeito da modificação do pH, substituição da fonte de carbono e adição de nisina e EDTA sobre o crescimento dessa bactéria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a Resolução nº 63, de 6 de julho de 2000 do ANVISA/MS (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Alimentos para Nutrição Enteral), nutrição enteral é aquela usada para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializada, utilizada exclusiva ou parcialmente, para substituir ou complementar, a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BRASIL, 2000).

A alimentação enteral apresenta vantagens em relação à parenteral por estimular as funções e estrutura do intestino e a microbiota intestinal (IDENO, 1993). É principalmente usada para prover uma nutrição efetiva em pacientes incapazes de se alimentar por via oral e, ainda que a terapia seja segura e salve vidas, a alimentação por sonda enteral está associada a diversas complicações, dentre elas a possibilidade de contaminação microbiana (ANDERTON, 1986).

Estudos comprovaram que as fórmulas enterais apresentam risco microbiológico elevado, pois, por ser rica em nutrientes, apresentar atividade de água alta e pH neutro possibilitam o crescimento de microrganismos contaminantes. Além disso, as vias de administração utilizadas podem permitir que alguns dos sistemas naturais de defesa do organismo sejam invadidos, pois, em alguns casos, a sonda invade a barreira ácida do estômago e leva o alimento ao duodeno e ao jejuno. Nesse meio, com o pH alcalino, os microrganismos contaminantes podem proliferar e colonizar o intestino, cuja microbiota residente pode ter sido diminuída, significativamente, pelo uso sistêmico de antibióticos (Shootes et al., 1971 e Remington e Schimpff, 1981 citados por ARIAS et al., 1998). A transmissão de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos, via alimentos, é particularmente importante quando ocorre em indivíduos hospitalizados, muitas vezes debilitados por doenças graves ou por uma nutrição inadequada ou ainda, em consequência dos procedimentos de quimioterapia (PELCZAR Jr. et al., 1993). WEENK et al. (1995) relataram que esse grupo de doentes inclui pacientes cirúrgicos e hospitalizados, bebês prematuros e pacientes em Unidade de Tratamento Intensivo.

De acordo com CASEWELL et al. (1981) e ANDERTON (1983, 1984), o risco potencial de pacientes serem contaminados por dietas enterais tem sido muito alto. Segundo DOROTHY et al. (1990), um terço dos pacientes que recebem alimentação enteral em Unidades de Tratamento Intensivo de um hospital da cidade de Oklahoma nos Estados Unidos desenvolveram diarreia depois da alimentação. A diarreia nesse tipo de paciente pode ser atribuída à hypoalbuminemia, à contaminação bacteriana e, concomitantemente, à terapia com drogas (BURNS e JAIRATH, 1999).

DU MOULIN et al. (1982) também enfatizaram o fato de que muitos pacientes que utilizam nutrição nasogástrica são tratados com antiácidos ou protetores gástricos que elevam o pH do estômago de 2,0 para aproximadamente 5,5 e, dessa forma, há o favorecimento do crescimento de bactérias. Tratamentos com antibióticos, esteróides e imunodepressores também podem alterar a microbiota natural dos pacientes, predispondo-os a infecções com bacilos Gram-

negativos, *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans*, particularmente quando esses pacientes recebem dieta nasoentérica, que passa diretamente para o duodeno (ANDERTON, 1983).

A contaminação da fórmula enteral é a primeira etapa para o acesso dos microrganismos ao organismo humano. A presença de microrganismos na dieta enteral pode resultar da contaminação cruzada de equipamentos, utensílios e das superfícies de trabalho higienizados inadequadamente, de ingredientes ou de outros aditivos utilizados na preparação ou na modificação da fórmula, de manipuladores, de equipos e sistemas de administração (ANDERTON, 1993; CROCKER et al., 1996). Os contaminantes encontram condições adequadas para o crescimento nesse tipo de alimento, como a composição rica em nutrientes, atividade de água alta e pH neutro, bem como o tempo e a temperatura ambiente durante o período em que é administrado aos pacientes (BASTOW et al., 1982; NAVAJAS et al., 1992 e ARIAS et al., 1998).

ANDERTON (1983) encontrou contagens microbianas da ordem de 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL em dietas comerciais e preparadas em hospitais. As dietas são provavelmente contaminadas durante o processo de mistura ou diluição da alimentação e adição nos frascos de administração. Assim, é provável que as dietas enterias preparadas na cozinha dietética estejam contaminadas com 10^2 a 10^3 UFC mL⁻¹ de microrganismo imediatamente depois da preparação (ANDERTON, 1983).

Os microrganismos mais freqüentemente encontrados contaminando dietas enterais são bactérias Gram-negativas como *Klebsiella* ssp. (SCHOOTER et al., 1971, CASEWELL e PHILLIPS, 1978; MONTEGOMERIC, 1979; COOKE et al., 1980, ANDERTON, 1983, THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998), *Enterobacter cloacae* (CASEWELL et al., 1981; LEVY et al., 1989, THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998), *Escherichia coli* (SCHOOTER et al., 1971; ANDERTON, 1983; ARIAS et al., 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (SCHOOTER et al., 1971; ANDERTON, 1983), *Acinetobacter* sp. (BUSSY et al., 1992), *Serratia marcescens* (THURN et al., 1990) e *Salmonella enteritidis* (GILL e GILL, 1981; ANDERTON, 1983).

COSTA et al. (1998) consideraram que *K. pneumoniae* é uma das bactérias contaminantes mais freqüentemente encontradas em dietas enterais. CASEWELL e PHILLIPS (1978) relataram que em 47, amostras 32 (68 %) estavam contaminadas com 10^4 UFC mL⁻¹ de *Klebsiella* spp.. Nesse estudo, a presença de *Klebsiella* spp. foi também verificada em equipamentos, utensílios e superfícies de trabalho no setor de nutrição e dietética dos hospitais. Os resultados mostraram que os isolados tinham o mesmo tipo capsular daqueles isolados das dietas enterais. *Klebsiella oxytoca* e *K. pneumoniae* também foram isoladas de dietas enterais artesanais por PEREIRA et al. (2000) e apresentaram características moleculares diferentes. Alguns desses isolados apresentaram capacidade de se instalarem no intestino de camundongos alimentados com dietas enterais inoculadas e de translocarem para outros órgãos, como fígado e pulmão (PEREIRA, 2001). OKUMA et al. (2000) relataram que a incidência de contaminação microbiana em fórmula enteral antes e depois da administração foi de 1 em 49 amostras (2,0%) e de 10 em 48 amostras (20,8%), respectivamente. Esses mesmos autores verificaram que amostras da dieta de dois pacientes com diarreia e duas amostras de 23 pacientes sem diarreia estavam contaminadas com 10^4 UFC/mL ou mais e as bactérias encontradas foram *K. pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*.

Klebsiella é um patógeno oportunista e é, depois de *E. coli*, a causa mais comum de septicemia provocada por bactérias Gram-negativas, com taxa de mortalidade de até 50 % (HANSEN et al., 1998). No Brasil, de acordo com o primeiro levantamento das infecções hospitalares em 1994, pelo Ministério da Saúde, 18,1 % das bactérias encontradas em infecções foram identificadas como *Klebsiella*, ficando atrás somente de *Pseudomonas aeruginosa* com 19,6 % dos casos investigados (BRASIL, 1995). De acordo com FELDMAN et al. (1990), os fatores que predispõem às infecções hospitalares por *K. pneumoniae* ou *K. oxytoca* são: idade avançada, alcoolismo crônico, doenças renais, pulmonares e cardíacas crônicas ou doenças neoplásicas.

Klebsiella pode ser encontrada em indivíduos sadios residentes urbanos, trabalhadores de hospitais e pacientes, numa proporção que varia entre 30 a 37%

sendo 29 a 35% de origem entérica e 3 ou 4% são encontradas na orofaringe (DAVIS e MATSEN, 1974). Espécies de *Klebsiella* são mais freqüentemente isoladas dos tratos urinários e respiratórios, embora também sejam encontradas em bacteremia, úlceras, meningites e infecções de ouvido (CASEWELL et al., 1981).

Isolados de *K. pneumoniae* de água são capazes, como os isolados clínicos, de expressar fatores de virulência (PODSCHUN et al., 2001). A cápsula de exopolissacarídeos tem sido geralmente relacionada como um importante fator de virulência em *Klebsiella* (DOMENICO et al., 1982) a qual, na ausência de um antígeno específico, permite aos organismos evitar a fagocitose (WILLIAMS et al., 1986). Diferente de outras enterobactérias, *K. pneumoniae* contem uma grande cápsula de polissacarídeos envolvida na colonização, adesão, manutenção e proliferação dessa espécie no hospedeiro (Sutherland, 1978 citado por TOMAS et al., 1986).

Embora *K. pneumoniae* não seja comumente considerada como enteropatógeno veiculado por alimentos, existem estudos que relatam esta bactéria como agente causal de gastroenterites. RENNIE et al. (1990) relataram um surto, onde a análise do padrão plasmidial dos isolados e a enterotoxina em amostras fecais e do alimento sugeriram *K. pneumoniae* como o agente causador da síndrome. SABOTA et al. (1998) relataram um caso onde *K. pneumoniae* é considerado um patógeno enteroinvasivo de origem alimentar, onde a ingestão de hambúrguer contaminado por essa bactéria causou sepses em adulto saudável, sendo que os isolados do sangue e do produto tinham o mesmo padrão plasmidial, bioquímico, sensibilidade a antimicrobianos e produziam enterotoxinas termossensíveis.

O crescimento de bactérias contaminantes em dietas enterais ocorre em taxas elevadas, principalmente em razão de fatores como, valor nutricional, pH próximo da neutralidade, alta atividade de água e tempo prolongado de administração à temperatura ambiente.

Simulações com *E. coli* em sistemas de dietas enterais, com incubação de 25 a 37°C, demonstraram que a presença de uma única célula poderá, em 16

horas, resultar em uma concentração de 10^2 a 10^7 UFC mL⁻¹ e isso constituiu um risco para os pacientes (ANDERTON, 1984). A contaminação experimental de dietas enterais com *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* e *E. cloacae* em números de 10^2 a 10^3 UFC/mL com subsequente incubação a 4, 25 e 37 °C, evidenciou que todas as bactérias cresceram rapidamente a 25 e 37 °C em algumas dietas enterais com pH baixo entre 4,0 e 5,0 e alta osmolaridade, bem como naquelas com pH próximo de 7,0 e isotônicas (ANDERTON, 1985). LEE e HODGKISS (1999) observaram que, depois de quatro horas da dieta ter sido manipulada, foi detectada uma contagem de células viáveis de *E. coli* de $0,5 \times 10^1$ UFC mL⁻¹ que aumentou para $7,3 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ depois de 24 horas. Em um ensaio onde as mãos de membros da equipe dietética foram contaminadas experimentalmente com, aproximadamente, 10^3 UFC/cm² de células de *E. coli*, esses mesmos autores relataram que a contagem de células viáveis em dietas enterais foi de $1,2 \times 10^1$ UFC mL⁻¹ após 4 horas de incubação e de $1,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ depois de 24 horas. OLIVEIRA et al. (2000) relataram que a contagem de mesófilos aeróbios em 15 amostras de dietas enterais alcançou de $8,5 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e o Número Mais Provável (NMP/mL) de coliformes foi maior do que $1,1 \times 10^2$. Essas dietas estavam incubadas em refrigerador, por 17 horas onde a temperatura variou de 9,6 a 13,8 °C.

O crescimento de *Salmonella enteritidis* Typhimurium em dietas enterais artesanais e industrializadas, incubadas a 25°C e a 4°C, ocorreu a uma velocidade específica de crescimento entre 1,19 e 1,98 h⁻¹ e tempo de geração variando entre 21 a 34,8 minutos (SILVA, 2000). Pelos dados obtidos, pode-se prever que uma população inicial de *Salmonella* de 10^3 UFC mL⁻¹ pode alcançar 10^8 UFC mL⁻¹ entre 14 e 24 horas de incubação a 25 °C, indicando um risco potencial para os pacientes, mesmo que a contaminação inicial seja com um número baixo.

Dietas enterais são alimentos constituídos de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais sendo, esses substratos, considerados ótimos para o crescimento dos microrganismos. Entre as alternativas para reduzir a taxa de crescimento bacteriano nessas dietas pode-se considerar a alteração do pH, a

incorporação de fontes de carbono e energia que não sejam facilmente metabolizadas pela microbiota contaminante e o uso de conservantes.

O efeito do abaixamento do pH sobre o crescimento microbiano foi demonstrado por OVESEN et al. (1991) em duas fórmulas enterais com valores de pH 6,6 e 4,2. O crescimento bacteriano foi inibido na fórmula com proteína de soja parcialmente hidrolisada e com o pH 4,2.

A utilização de nutrientes como o xilitol em dietas enterais pode afetar a atividade microbiana, pois segundo MÄKINEN (2000), o metabolismo de carboidratos com seis carbonos, como a glicose é freqüentemente inibido por carboidratos com cinco carbonos, como o xilitol. ZABNER et al. (2000) verificaram que *P. aeruginosa* não cresceu em meio M9 adicionado de xilitol como única fonte de carbono. Esses autores também verificaram que o xilitol não permitiu o crescimento de *S. aureus* e de bactérias isoladas da mucosa nasal. O xilitol é um poliálcool derivado da xilose, a pentose encontrada na parede celular de vegetais. Sua fórmula estrutural é $C_5H_{12}O_5$ (EMODI, 1978; HYVÖNEN e KOIVISTOINEN, 1982). Esse poliálcool pode ser encontrado na natureza em diversos organismos. Xilitol tem sido encontrado em pequenas quantidades em muitas frutas, legumes, verduras (WASHÜTTL et al., 1973). A incorporação de xilitol em alimentos é permitida, por esse ser uma substância atóxica e, portanto, reconhecido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O seu uso foi liberado no Brasil em 1980 pelo processo N° 4624/79, comunicado N° 730/80, de 7 de julho de 1980, do Ministério da Saúde.

O xilitol pode ser usado em produtos de padaria, confeitaria e sorveteria, derivados de leite, geléias e bebidas (HYVÖNEN e KOIVISTOINEN, 1982). Segundo YLIKAHRI (1979), o xilitol apresenta efeitos fisiológicos interessantes, não é carcinogênico e não requer insulina para ser metabolizado, podendo ser usado como adoçante para diabéticos devido o fato deste poliálcool ser absorvido lentamente pelo organismo humano, sendo seu transporte feito por difusão passiva ou facilitada não causando, dessa forma, mudanças rápidas na concentração de glicose no sangue. A dose usualmente tolerada é de 20 a 40 gramas/dia para pessoas não adaptadas segundo Lang (1971) e Mäkinen (1976)

citados por YLIKAHRI (1979). Doses maiores do que 20 a 40 gramas/dia podem causar diarreia osmótica em alguns indivíduos, mas esse efeito cessa após um período de adaptação.

EMODI (1978) afirmou que o xilitol não é utilizado por muitos microrganismos e os produtos que o contém geralmente apresentam maior conservação. MÄKINEN e SOEDERLING (1981) observaram uma diminuição no crescimento de *Clostridium butyricum* e *Lactobacillus bulgaricus* na presença de 0,5 % de xilitol e 0,5 % de glicose. Combinando as propriedades fisiológicas e vantagens organolépticas, os autores sugeriram que o xilitol pode ser usado na preservação de certos alimentos.

O adonitol, um poli álcool que só é fermentado por 25 a 75 % das espécies de *Klebsiella* (ORSKOV, 1984) é uma alternativa para ser incorporado em dietas enterais com o objetivo de afetar o crescimento dessa bactéria. Outra alternativa para diminuir o crescimento bacteriano em dietas enterais seria a adição de carboidratos poucos fermentescíveis pela microbiota contaminante e que estimulasse o crescimento de bactérias consideradas benéficas ao homem.

Segundo a *American Dietetic Association* (1997), as fibras apresentam muitos benefícios para a saúde e exercem um papel importante na manutenção da saúde e prevenção de doenças e também podem ser usadas como um componente da terapia nutricional médica. As aplicações potenciais das fibras na nutrição enteral são muito amplas. Inicialmente, as fórmulas enterais comerciais não continham fibras. Mas, com a constatação de que as fórmulas sem fibras causavam constipação ou diarreia passou-se então a adicionar fibras originalmente de soja, às fórmulas enterais, a fim de minimizar esses problemas. Atualmente, as fórmulas enterais incluem diferentes tipos de fibras, incluindo fibras solúveis, fibra insolúvel, inulina e frutooligossacarídeos (NESTLÉ, 2002). A diarreia é freqüente em pacientes que estão recebendo nutrição enteral, com uma incidência estimada de 25 a 65 % (SILK, 1993). As fibras são freqüentemente, eficazes na redução da constipação e diarreia, ambos males associados com a nutrição enteral. Embora as fibras sejam benéficas em várias situações de curto prazo, é na nutrição enteral de longo prazo que seus benefícios são maiores.

De acordo com ROBERFROID (1993; 1998), carboidratos classificados como fibras possuem propriedades fisiológicas específicas tais como: não serem hidrolizados por enzimas digestivas humanas e serem fermentados no cólon por uma microbiota específica; características semelhantes são encontradas em fibras como a inulina e frutooligossacarídeos.

Alguns carboidratos fermentáveis, mas, indigeríveis podem, seletivamente, estimular certos grupos bacterianos no cólon tais como bifidobactérias, eubactérias e lactobacilos, considerados benéficos para os seres humanos e são, coletivamente, chamados de prebióticos (HOLZAPFEL et al., 2002). Compostos denominados bifidogênicos, também denominados prebióticos, são aqueles que promovem seletivamente a proliferação das bifidobactérias nos seres humanos podendo diminuir o número de bactérias patogênicas (GIBSON et al., 1995; ROBERFROID et al., 1998). Embora existam outros oligossacarídeos da soja, xilooligossacarídeos entre outros, até o momento, somente frutooligossacarídeos-FOS e inulina são considerados prebióticos (BORGES, 2000).

A inulina é um polímero de frutose extraída da raiz de chicória ou produzida industrialmente a partir da sacarose e contém cadeias de 2 a 60 unidades de frutose. Os FOS (ou oligofrutose) contêm de 2 a 9 unidades de frutose que são, algumas vezes, ligadas a uma unidade de glicose terminal (MOLIS et al., 1996). De acordo com MITSUOKA (1990) e BENGMARK et al. (2001), a inulina e os FOS podem ser encontrados em diversos alimentos como o alho, cebola, aspargos, tomate, alcachofra, banana, cevada, mel, centeio, trigo, entretanto, em poucas quantidades.

Embora não haja nenhuma recomendação dietética formal para a inulina e os FOS, BOUHNİK et al. (1999) sugerem que a ingestão de cerca de 10 g/dia seja uma dose ideal e bem tolerada e que promoveu um aumento significativo na contagem de bifidobactéria em fezes de voluntários saudáveis. Esses autores também observaram um excesso de flatulência em pessoas que ingeriram 20 g/dia de inulina e FOS. GIBSON et al. (1995) demonstraram claramente um efeito laxativo em 136 de 154 voluntários que ingeriram doses de 15 g/dia de FOS.

CUMMINGS et al. (2001) relataram que a ingestão de 14 g/dia de inulina aumentou significativamente a ocorrência de flatulências, cólicas abdominais e estomacais e inchaço. Outros estudos com dosagens entre 5 e 20 g/dia de frutooligossacarídeos mostraram que o aumento da dose é relacionado com o aumento da flatulência (KAMAGUCHI et al., 1993; GIBSON et al., 1995). TOMOMATSU (1994) e ROBERFROID et al. (1998) afirmaram que o efeito bifidogênico é constatado a partir de doses pequenas de 4 a 8g/dia de FOS. A ingestão de 8g FOS/dia normalizou as fezes líquidas de pacientes (TOMOMATSU, 1994) e segundo ROBERFROID et al. (1998), o efeito antidiarréico do FOS é uma consequência da sua ação bifidogênica.

O valor calórico de FOS estimado por MOLINS et al. (1996) foi de 9,5 KJ/g e esses autores concluíram que, em humanos saudáveis, FOS foi ligeiramente digerido no intestino delgado e foi fermentado no cólon, reduzindo a energia produzida.

MOLINS et al. (1996) relataram que 89 % do FOS ingeridos atingem o cólon onde são totalmente fermentados, não sendo detectado resíduos no material fecal. Portanto, a eficiência desta substância depende da população microbiana presente no cólon, que varia de indivíduo para indivíduo.

Segundo ROBERFROID (1993) e YUN (1996), as bifidobactérias protegem contra espécies bacterianas invasivas e patogênicas ao secretarem substâncias antibacterianas, competindo por locais de substratos ou aderência ou estimulando o sistema imunológico. De acordo com GIBSON e WANG (1994a), algumas espécies de bifidobactérias são capazes de desempenhar efeitos antimicrobianos sobre alguns patógenos intestinais Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Salmonellae*, *Campylobacter* e *E. coli*. Produtos finais da fermentação de inulina e FOS, tais como ácidos propiônico, acético, butírico e láctico podem abaixar o pH no intestino (KAWASE, 1982 e RASIC, 1983). TOMOMATSU (1994) afirmou que os efeitos supressores desses ácidos são eficazes contra *Salmonella* e *E. coli*. Bifidin, um antibiótico produzido por *Bifidobacterium bifidum*, é efetivo contra *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e outras bactérias (Anand et al., 1984 e 1985 citados por TOMOMATSU, 1994).

A ingestão de inulina e FOS por voluntários humanos alterou a composição da microbiota intestinal, favorecendo as bifidobactérias (GIBSON et al., 1997). O aumento no número de bifidobactérias em alimentos infantis matinais foi um dos fatores que contribuiu para melhorar a competição com patógenos (GIBSON et al., 1997 e ROLFE, 2000). GIBSON (1999) relatou que a mudança de glicose por frutooligossacarídeos em uma dieta para voluntários causou o aumento de bifidobactérias, enquanto bacterióides, fusobactérias e clostrídios decresceram em número. A população de outras bactérias avaliadas como aeróbios totais, lactobacilos, coliformes e cocos Gram-positivos, permaneceu sem mudanças. Resultados similares foram encontrados com alimentação humana acrescida de inulina (Raftiline[®] ST). ROBERFROID (1993) encontrou resultados que demonstraram em estudo *in vitro* com bactérias, que FOS é um substrato tão adequado quanto glicose, para o crescimento de todas as bifidobactérias e bacterióides avaliados, além de *K. pneumoniae*, *Streptococci* e *Clostridium butyricum*. A ingestão de inulina e FOS, além de promover o aumento das bifidobactérias no intestino humano, apresenta outros benefícios importantes como: estimulação da produção de enzimas digestivas tais como as lisoenzimas e caseína fosfatase; diminuição dos níveis de colesterol e amônia no sangue e aumento da absorção, no cólon, de cálcio e, possivelmente, de magnésio (GIBSON e ROBERFROID, 1995). De acordo com EBIHARA e NAKAMOTO (1998), inulina e FOS previnem diarreias causadas por microrganismos patogênicos através da produção de ácidos graxos de cadeias curtas que estimulam a absorção de sódio e água no cólon e promovem o desenvolvimento da mucosa intestinal e estimulam a mobilidade intestinal (MOLIS et al., 1996; GIBSON, 1999; RAYERS et al., 2002).

SILK (1993) relatou que as fibras reduziram a translocação bacteriana em nódulos linfáticos de ratos. Uma solução de nutrição enteral contendo fibras reduziu a taxa de infecções pós-operatório em comparação com nutrição parenteral e dieta enteral sem adição de fibras (RAYES et al., 2002). Existem várias razões para entender porque o sucesso das fórmulas enterais sem adição de fibras não é atingido, e provavelmente, a razão mais importante é a

necessidade de se criar condições que favoreçam a estimulação do sistema imunológico do cólon, até hoje negligenciado. As fórmulas que não contêm fibras não aumentam a fermentação no cólon e dessa forma, não criam condições de favorecimento do sistema imune. É racional assumir que a adição de fibras (prebióticos) em dietas enterais pode, significativamente, melhorar a eficácia dessas soluções nutricionais (BENGMARK et al., 2001).

Portanto a ingestão de alimentos enriquecidos com prebióticos poderia ser benéfica, principalmente em situações em que a microbiota esteja negativamente alterada, em estados fisiológicos alterados ou na velhice, em que o número de bifidobactérias acha-se normalmente reduzido (BORGES, 2000). De acordo com GIBSON et al. (1995) a concentração de bifidobactérias parece diminuir com a idade e em humanos com mais de 55 anos a contagem fecal de bifidobactérias diminui em comparação com pessoas jovens. Existe uma analogia potencial entre a redução da resistência ao patógeno e o aumento do número de bifidobactérias em pessoas idosas e a produção de fatores naturais de resistência. A intenção de acrescentar prebióticos em alimentos para selecionar a população bacteriana em pessoas idosas pode ter muito valor (GIBSON, 1999).

A inibição ou retardamento do crescimento microbiano em dietas enterais, pode ser alcançado também pela presença de conservantes. Estudos prévios têm sido feitos para determinar a eficiência de nisina como aditivo para preservar diferentes alimentos como: queijo *cottage*, ovos, *brandy* e alimentos enlatados (GIBBS e HURST, 1991 e DELVES-BROUGHTON et al., 1992). A nisina é um polipeptídeo antibacteriano produzido pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* composto de 34 aminoácidos e de peso molecular de aproximadamente 3,510 Da (HURST, 1981). Foi à primeira bacteriocina obtida industrialmente a partir de uma bactéria láctica, com aprovação pelo FDA em 1988 e é permitida em mais de 46 países (DELVES-BROUGHTON, 1990). Dentre as bacteriocinas, a nisina vem despertando grande interesse como conservante, sendo praticamente a única permitida em alimentos. É considerada uma substância GRAS por não apresentar toxicidade ao homem (FDA, 1988).

De acordo com JAY (1992), a nisina apresenta algumas características desejáveis tais como: termoestabilidade e excelente estabilidade durante o armazenamento, destruição por enzimas digestivas e não confere sabores ou odores desagradáveis ao alimento.

Segundo STEVENS et al. (1991), KALCHAYANAND et al. (1992), BOZIARIS e ADAMS (1999) e CERRUTTI (2001), embora a nisina tenha efeito inibidor sobre muitas bactérias Gram-positivas, inclusive esporos bacterianos, estudos demonstraram a inibição de bactérias Gram-negativas, principalmente quando nisina é associada a agentes quelantes como: EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), trisódio ortofosfato, monohidrato cítrico e pirofosfatos ou a tratamentos que induzam a uma injúria subletal. Bactérias Gram-negativas submetidas a estresses térmicos, congelamento e a ácidos fracos, tornaram-se sensíveis a nisina (KALCHAYANAND et al., 1992). Agentes quelantes, como o EDTA, se ligam ao íon magnésio da membrana de lipopolissacarídeo e produzem na célula uma susceptibilidade a antibióticos e detergentes desestabilizando a membrana de lipopolissacarídeos.

Os sais de cálcio e sódio de EDTA a 100 ppm são aprovados para o uso em alimentos como agente quelante. O EDTA não tem muito efeito antimicrobiano, mas possui a capacidade de quelar cátions divalentes, desestabilizando as funções de barreira da membrana externa de bactérias Gram-negativas e também age na parede celular de bactérias Gram-positivas. Desta maneira, aumenta a ação antimicrobiana de outros compostos químicos, especialmente daqueles que agem sobre a membrana, tais como compostos ativos de superfície, antioxidantes, lisoenzimas e bacteriocinas (RAY, 1996). O EDTA é estável a temperaturas elevadas e facilita o processo de solubilização de proteínas (ANDRADE e MACÊDO, 1995).

Segundo STEVENS et al. (1991) a ação da nisina ocorre na membrana citoplasmática da célula vegetativa. O dano celular causa a perda da força protomotora devido à quebra da integridade da membrana. A membrana externa de bactérias Gram-negativas atua como uma barreira de permeabilidade seletiva

para a célula e impede que moléculas como antibióticos e detergentes atinjam a membrana citoplasmática.

RAMSEIER (1960) enfatizou os numerosos fatores que afetam a atividade antimicrobiana da nisina. O mais importante é a quantidade e idade do inóculo, a composição do meio e pH da solução na qual a nisina será dissolvida antes de ser adicionado ao meio. A molécula de nisina por natureza é ácida e apresenta grande estabilidade em condições ácidas. Ela é mais solúvel em pH mais baixo e mostrou ser mais estável a 115,6 °C quando em pH 2,0 (HURST, 1981). Esse mesmo autor verificou perda de 40% da sua atividade a 115,6 °C em pH 5,0 e mais de 90% em 6,8. Campbell e Sniff (1959) citados por HURST (1981) usaram suco de tomate com pH ajustado para diferentes valores e confirmaram o aumento da eficiência de nisina em pH baixo. A um pH 5,3, todas as 31 estirpes de *Bacillus coagulans* foram inibidas com 200 UI de nisina, enquanto nenhuma das estirpes foi inibida a um pH 7,2 com 560 UI de nisina.

STEVENS et al. (1991) demonstraram que quando células de bactérias Gram-negativas são tratadas com 20 mM EDTA e 50 µg/mL de nisina em uma solução tampão com um valor de pH 6,9 e incubadas a 37 °C, populações de *Salmonella* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii* e *E. coli* O157:H7 foram reduzidas de três a seis ciclos logaritmos de UFC/mL. CUTTER e SIRAGUSA (1995b) demonstraram que nisina combinada com agentes quelantes reduziram de maneira eficaz populações de bactérias Gram-negativas como *Salmonella typhimurium* e *E. coli* O157:H7, nas temperaturas de 5 a 42 °C. Tratamentos com nisina e nisina combinada com EDTA em *E. coli* O157:H7 promoveram reduções de um ciclo logaritmo de UFC/cm² e de 0,8 ciclo logaritmo de UFC/cm², respectivamente, (ZHANG et al., 1999). NATRAJAN e SHELDON (2000) constataram a inibição de *Salmonella* por nisina associada ao EDTA, enquanto CERRUTI et al. (2001) verificaram redução de quatro a cinco ciclos logaritmos no número de células viáveis de *E. coli* quando nisina foi associada a pH entre 5,5 a 6,5 e a atividade de água de 0,97 a 0,98.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-Minas Gerais.

3.1- Microrganismo

Os experimentos foram conduzidos com a estirpe P15 de *Klebsiella pneumoniae* isolada de dieta enteral proveniente de uma unidade hospitalar da Zona da Mata Norte (MG) por PEREIRA et al. (2000). Esta estirpe de *K. pneumoniae* foi capaz de colonizar o intestino de camundongos alimentados com dieta enteral inoculada com uma mistura de isolados de *Klebsiella*. Também foi capaz de translocar para o pulmão dos animais imunodeprimidos (PEREIRA, 2001).

Os estoques da cultura foram mantidos congelados a -86 °C em caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Merck) contendo 20 % de glicerol.

Antes de cada experimento, a cultura de *K. pneumoniae* foi ativada por duas vezes consecutivas em caldo BHI a 37 °C, por 18 horas. As células foram então coletadas em centrifuga refrigerada (Sorvall RT 6000 D) a 2000 *g* em temperatura próxima a 4 °C. As células coletadas foram ressuspensas em

solução salina 0,85 % e diluídas até se obter 0,4 de absorvância em espectrofotômetro SPECTRONIC 20D (Milton Ray) a 630 nm, o que correspondeu a, aproximadamente, $3,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Diluições seriadas foram realizadas para que fossem inoculadas cerca de 10^2 a 10^3 UFC mL⁻¹ na dieta enteral, previamente distribuída em frascos de 100 mL com tampa rosqueável.

3.2- Determinação do crescimento de *K. pneumoniae* em diferentes fontes de carbono

Para se avaliar o crescimento de *K. pneumoniae* em diferentes fontes de carbono, utilizou-se caldo nutriente (Merck) na concentração dupla, acrescido de uma solução a 2 %, dos seguintes nutrientes: Oligossac (Support®), Oligossac (Support®) mais Triglicerídeos de Cadeia Média-TCM (Support®), adonitol (Merck), xilitol (Merck), frutooligossacarídeos (Raftilose P95 - Orafti®), inulina (Raftiline ST - Orafti®), glicose (Sigma), amido (Vetec), sacarose (Sigma). O dulcitol (Inlab) foi adicionado na concentração de 1 %.

Volumes de 2,5 mL de caldo nutriente em concentração dupla foram esterilizados em tubos de vidro com tampa rosqueável e adicionados de 2,5 mL das soluções esterilizadas de cada fonte de carbono. O meio de cultura foi inoculado com aproximadamente, 10^5 UFC/mL de *K. pneumoniae* e mantido a 37 °C em banho-maria (Termomix B. Braun Biotech International). O crescimento bacteriano foi acompanhado com espectrofotômetro SPECTRONIC 20D (Milton Ray) a 630 nm, em intervalos de 1 hora.

O experimento foi conduzido em duas repetições, com triplicata.

3.3- Determinação do crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais

Foram utilizadas dietas enterais El Diet (Support®), na forma de pó acondicionadas em pacotes contendo 90 gramas. As dietas foram preparadas conforme a recomendação do fabricante, pesando-se, asépticamente o pó e diluindo-o em água esterilizada. Volumes de 30 mL da dieta enteral foram distribuídos em frascos de 100 mL esterilizados.

O pH da dieta que, inicialmente foi 7,9, foi modificado para valores de 3,9; 4,9; 5,9 e 6,9 com ácido láctico 5 M esterilizado. O crescimento de *K. pneumoniae* em dietas com os diferentes valores de pH foi avaliado a 15, 20 e 25 °C, mantidas em estufa BOD por 48 horas. A cada intervalo de 4 horas de incubação, frascos contendo a dieta enteral com valores de pH diferentes foram removidos da estufa BOD para a determinação do número de células viáveis de *K. pneumoniae* em ágar MacConkey (Merck), pela técnica de plaqueamento por microgotas (HERIGSTAD et al., 2001), em duplicata.

O experimento foi conduzido em três repetições para cada tratamento realizado.

O crescimento de *K. pneumoniae* também foi acompanhado na dieta acrescentada de frutooligossacarídeos, inulina, nisina + EDTA com pH 5,0 e 5,5. O frutooligossacarídeo e a inulina foram adicionados à dieta na concentração de 10 g/dia conforme BOUHNİK et al. (1999). O efeito antibacteriano da nisina (Sigma) sobre *K. pneumoniae* foi avaliado adicionando-se 3 mg L⁻¹, que é três vezes maior que a concentração máxima de ingestão diária de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). O EDTA (Sigma) foi adicionado juntamente com a nisina para atuar como um agente quelante, na concentração máxima estabelecida pela Resolução nº 33, de 9 de março de 2001 do Ministério da Saúde, que é de 7,5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2001). As soluções de nisina e de EDTA foram esterilizadas pelo método de filtração, e adicionadas às dietas já preparadas.

O ajuste do pH das dietas para os valores de 5,0 e 5,5 foi feito com uma solução estéril de ácido láctico 5 M. A determinação do crescimento bacteriano foi como descrito anteriormente.

O experimento foi conduzido em duas repetições para cada tratamento realizado.

3.4.- Parâmetros cinéticos do crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais

Os dados de crescimento de *K. pneumoniae* obtidos foram usados para traçar as curvas de crescimento e determinar a fase lag, calcular a fase log, o tempo de geração e velocidade específica de crescimento (μ) em cada condição estudada.

A fase lag foi estimada graficamente, determinando-se a inserção da reta obtida pela regressão linear dos pontos relativos ao crescimento exponencial com o valor do número inicial de células.

A velocidade específica de crescimento (μ) de *K. pneumoniae* nas dietas enterais foi obtida selecionando-se os pontos obtidos experimentalmente e que correspondiam à fase log de crescimento. Em seguida, foi feita uma regressão linear e obtida a equação da reta, $y = ax+b$, sendo $a=\mu$.

O tempo de geração (τ) foi calculado em função de μ , onde $\tau=\ln 2/\mu$.

3.5- Determinação da acidez titulável

A acidez titulável da dieta enteral foi determinada no início do experimento e após 48 horas de incubação com o intuito de se avaliar a acidez expressa como porcentagem de ácido láctico. Para a titulação, utilizou-se hidróxido de sódio na concentração de 0,1 N e fenolftaleína como indicador (CASE et al., 1985).

3.6- Observação microscópica da cápsula de polissacarídeo

Preparações microscópicas para observação da presença de cápsula em *K. pneumoniae* foram feitas após o crescimento da bactéria em caldo nutriente com diferentes fontes de carbono e em dieta enteral El Diet[®] com o pH entre 3,9 e 7,9 a 25 °C e também acrescida de frutooligossacarídeos, inulina e nisina + EDTA com pH 5,0. A coloração para visualização da cápsula foi feita com tinta nanquim, de acordo com HARRIGAM e McCANGE (1976).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente com diferentes fontes de carbono.

O crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente variou de acordo com as fontes de carbono usadas para suplementar tal meio (Figuras 1 e 2). Fontes de carbono como adonitol, amido, dulcitol e xilitol no caldo nutriente resultaram em uma densidade ótica menor da cultura bacteriana ao final de 11 horas (Figura 1) sugerindo uma população final de células menor do que as observadas quando na presença das outras fontes de carbono. Estes resultados indicam que é possível reduzir o crescimento bacteriano de *K. pneumoniae* em dietas enterais e, provavelmente, outras bactérias contaminantes, pela modificação da fonte de carbono. Embora esta conclusão seja baseada nos resultados obtidos em caldo nutriente, pode-se supor que o comportamento de muitas bactérias seja semelhante quando cultivada em dieta enteral. A observação de que uma multiplicação rápida de *E. coli* ocorreu tanto em caldo nutriente como em dieta enteral feita por ANDERTON (1984) reforça esta hipótese. Esse autor verificou que, em oito horas de incubação a 23 °C, a população de *E. coli* variou de 10^2 UFC mL⁻¹ para 10^7 a 10^8 UFC mL⁻¹ em ambos substratos, concluindo que até uma única célula bacteriana poderá, em oito horas de incubação resultar em uma

concentração de alta de microrganismos sendo um perigo em potencial para pacientes imunodeprimidos.

Conforme informado pelo fabricante, os produtos à base de frutooligossacarídeos e inulina continham uma porcentagem de, no máximo, 8 % de glicose, frutose e sacarose. A presença desses carboidratos pode explicar o crescimento de três a quatro ciclos logarítmicos de *K. pneumoniae* no caldo nutriente incorporado dessas fontes de carbono (Figura 1). ROBERFROID (1993) em um estudo *in vitro* com *K. pneumoniae* encontrou resultados que demonstram que FOS é um substrato tão eficiente para o crescimento dessa bactéria quanto glicose.

O tempo de administração sugerido por ANDERTON (1986) para se manter a inocuidade da dieta enteral é que não se ultrapasse quatro horas, desta forma neste período as dietas enterais acrescidas de FOS e inulina poderiam ter sido administrada ao paciente sem o risco de crescimento bacteriano.

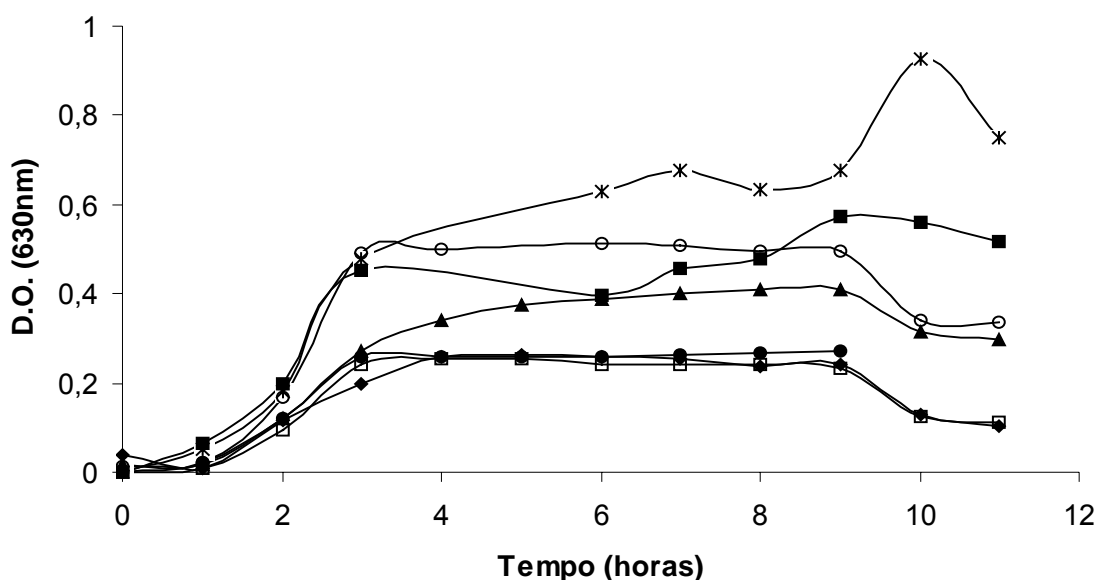


Figura 1. Crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente suplementado com diferentes fontes de carbono como inulina (■), frutooligossacarídeos (*), amido (▲), dulcitol (◆), adonitol (□), xilitol (●) e caldo nutriente (○).

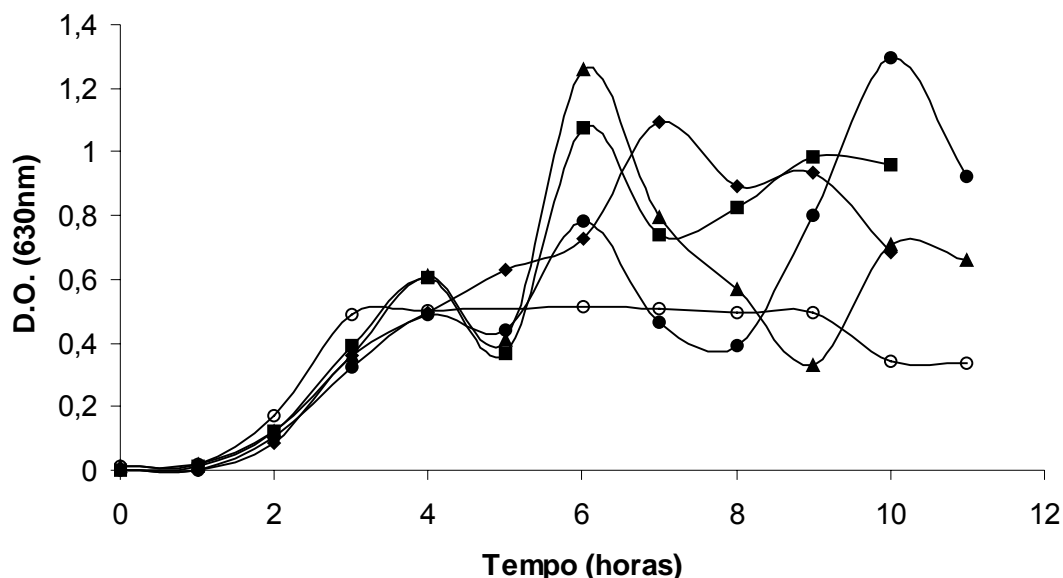


Figura 2. Crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente com diferentes fontes de carbono como glicose (■), sacarose (◆), oligossac[®] mais triglicéridos de cadeia média (▲), oligossac[®] (●) e caldo nutriente(○).

Contatou-se que o crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente foi maior na presença de 2 % das fontes consideradas mais calóricas como glicose, sacarose, Oligossac[®] (maltodextrina) e Oligossac[®] mais ácidos graxos de cadeia média (Figura 2).

As oscilações observadas na densidade ótica da cultura de *K. pneumoniae* na presença de fontes de carbono mais calóricas (Figura 2) podem ser atribuídas a presença de outros carboidratos contaminantes. Glicose é a fonte de carbono preferida pela maioria das bactérias heterotróficas, contudo há uma versatilidade muito grande na utilização de fontes de carbono e de energia (CALDWELL, 2000). De acordo com ROWAN e ANDERSON (1997) a suplementação de maltodextrina em fórmulas infantis estimula o crescimento de *Bacillus cereus* e a produção de enterotoxina. De acordo com BASTOW et al. (1982) o número e as espécies de microrganismos isolados de dietas enterais durante etapas de preparação e administração diferiram muito, dependendo da base da dieta, ou seja, se à base de proteínas ou de carboidratos (Caloreen[®]). Nas dietas industrializadas

suplementadas com carboidratos, *E. aerogenes*, *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* e *Proteus* spp foram encontradas na ordem de 10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹ após 24 horas de administração, enquanto na dieta a base de proteínas não foi detectada a presença de contaminantes. STANEK et al. (1983) observaram que o acréscimo de oligopeptídeos à dieta enteral contendo aminoácidos, lipídeos e carboidratos resultou em um aumento de dois e quatro ciclos logaritmos na população de *S. aureus* e *S. enteritidis* respectivamente, após 24 horas de incubação a 22 °C. ANDERTON (1985) observou o crescimento de *E. aerogenes* em dietas enterais industrializadas avaliadas com diferentes formulações, as quais diferiram na ausência ou presença de carboidratos e aminoácidos utilizados. A população inicial inoculada nas dietas enterais foi de, aproximadamente, 10^3 UFC mL⁻¹ e houve um aumento de aproximadamente três ciclos logaritmos em 24 horas de incubação a 25 e 37 °C em ambas as dietas. COSTA et al. (1998) relataram que dietas enterais a base de amido e a base de maltodextrina apresentaram contaminações com bactérias Gram-negativas como *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *E. asburiae*, além de bolores e leveduras. Entretanto, a dieta a base de amido apresentou um número maior de amostras que estavam contaminadas.

São necessárias mais pesquisas para avaliar fontes alternativas de energia e que sejam menos metabolizadas pelos microrganismos contaminantes para serem incorporadas nas dietas enterais e que contribuam para a segurança desses alimentos.

4.2. Crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais sob diferentes temperaturas e valores de pH

A manutenção das dietas enterais a 25 °C e os valores de pH inicial de 5,9 a 7,9 favoreceram um aumento de cerca de quatro a cinco ciclos logaritmos no número de células viáveis de *K. pneumoniae* P15, em um período de 26 horas de incubação (Figura 3). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por ANDERTON (1986) que verificou o aumento de seis ciclos logaritmos na população de *E. coli*, incubada em dietas enterais, após 24 horas a 37 °C. Embora

o abaixamento do pH da dieta enteral para valores de 4,9 tenha aumentado a fase lag e diminuído a velocidade específica de crescimento bacteriano, foi ainda possível verificar um aumento de três ciclos logaritmos na população de células viáveis de *K. pneumoniae* a 25 °C. Entretanto, no período de 4 horas não houve crescimento bacteriano e, desta forma, a dieta enteral poderia ter sido administrada aos pacientes sem risco de multiplicação desta bactéria (Figura 3). Estes dados estão de acordo com ANDERTON (1986) que afirmou que para se manter a inocuidade da dieta enteral, o tempo de administração não pode ser superior a 4 horas em temperatura ambiente. Segundo STANEK et al. (1983), o ajuste do pH da dieta enteral para 5,1 foi suficiente para inibir o crescimento de *S. enteritidis* a 22 °C, que cresceu de quatro a cinco ciclos logaritmos na mesma dieta com pH 6,5. ANDERTON (1985) relatou que *K. aerogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas aerogenes*, *E. cloacae* e *S. aureus* não cresceram em dieta com pH 5,4 durante as primeiras oito horas a 25 °C. Esse fato deveu-se provavelmente, à combinação do baixo pH, alta osmolaridade da dieta e a temperatura de incubação.

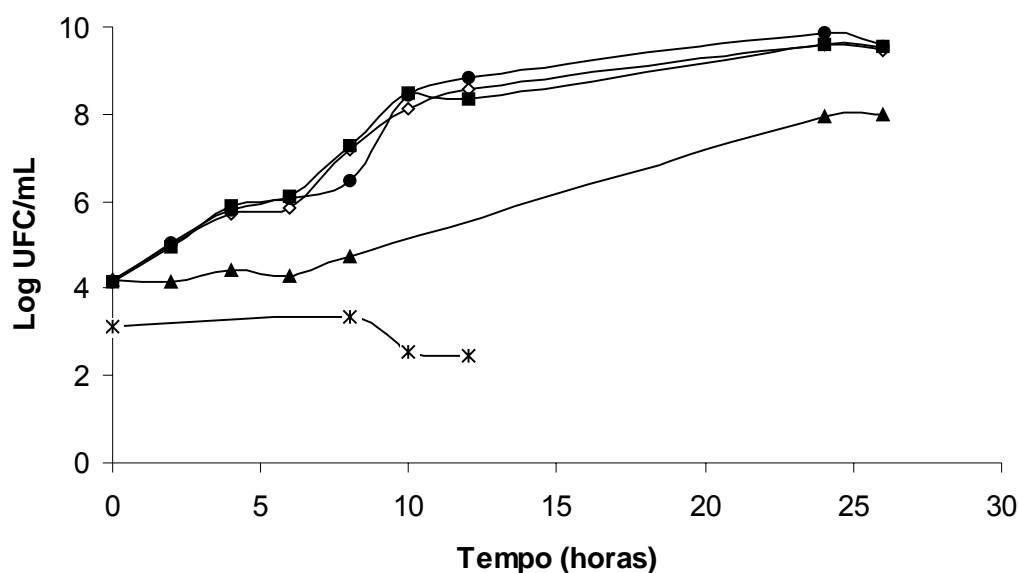


Figura 3. Logaritmo base 10 do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de *K. pneumoniae* em dieta enteral industrializada a temperatura de 25 °C em valores de pH 3,9 (*), 4,9 (▲), 5,9 (◇), 6,9 (■) e 7,9 (●).

Não se observou crescimento de *K. pneumoniae* em dieta enteral com pH 3,9 e não foi possível a recuperar células viáveis dessa bactéria pela técnica usada, após 12 horas de incubação (Figura 3). Entretanto, o uso desse pH na formulação de dietas enterais poderia promover, além da irritação na mucosa do intestino de pacientes já debilitados, o retardamento da motilidade gástrica (MITNE, 2000). Os dados encontrados por ARIAS et al. (1998) mostraram que o pH baixo não assegura a inocuidade das dietas enterais, pois esses autores relataram que dietas enterais à base de frutas, com pH 3,89 apresentaram contagens de 10^4 UFC g^{-1} de coliformes totais e de 10^3 UFC g^{-1} de *E. coli*.

A incubação das dietas enterais inoculadas com *K. pneumoniae* a 15 e 20 °C também resultaram no aumento de três a cinco ciclos logaritmos na população bacteriana em valores de pH de 5,9 a 7,9 (Figuras 4 e 5). Estes resultados reforçam o alerta sobre o risco da manutenção do acondicionamento das dietas enterais a temperaturas ambientes e em refrigeradores onde as temperaturas baixas não são mantidas. POTTECHER et al. (1979) e BASTOW et al. (1982) enfatizaram que dietas enterais são, muitas vezes, preparadas a temperatura ambiente e deixadas por horas sem refrigeração. Como essas dietas são preparadas para serem administradas ao longo do dia o tempo e temperatura inadequados podem contribuir para o crescimento de microrganismos. Contagens de 10^8 a 10^9 UFC mL^{-1} de aeróbios mesófilos foram constatados por BASTOW et al. (1982) em dietas enterais formuladas em hospitais e mantidas à temperatura ambiente (21 a 24 °C) por 24 horas. ANDERTON (1983) alertou para a gravidade do problema quando detectou contaminações da ordem de 10^6 a 10^9 UFC mL^{-1} , em alimentação dada aos pacientes de Unidade de Tratamento Intensivo. Essa população elevada ocorreu, aparentemente, em razão do transporte não refrigerado, da manipulação ocorrida antes da administração da dieta aos pacientes e da temperatura ambiente, a qual dietas enterais são administradas.

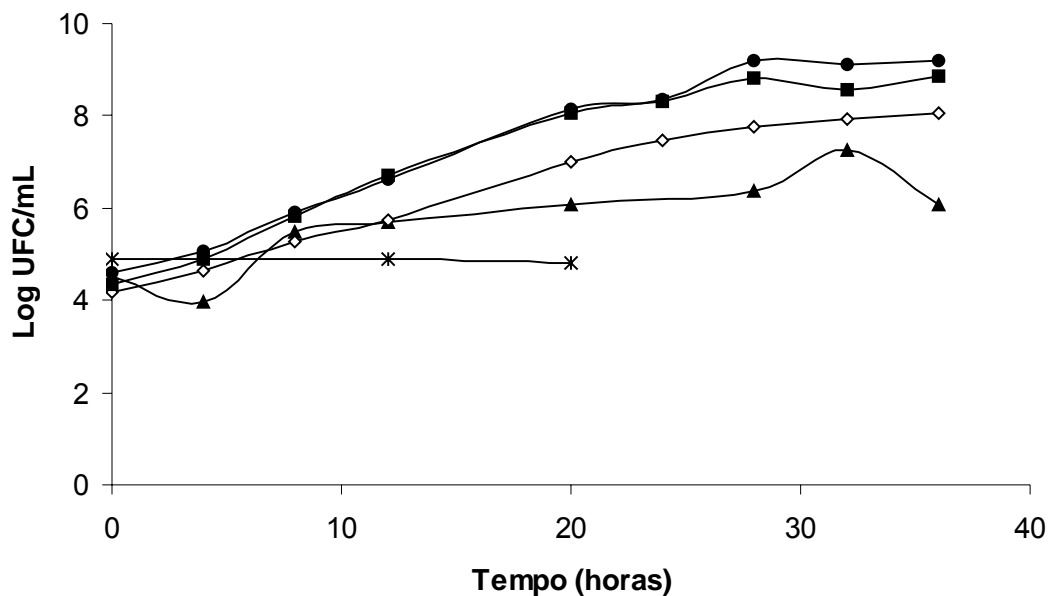


Figura 4. Logaritmo base 10 do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de *K. pneumoniae* em dieta enteral industrializada a temperatura de 20 °C em valores de pH 3,9 (*), 4,9 (▲), 5,9 (◇), 6,9 (■) e 7,9 (●).

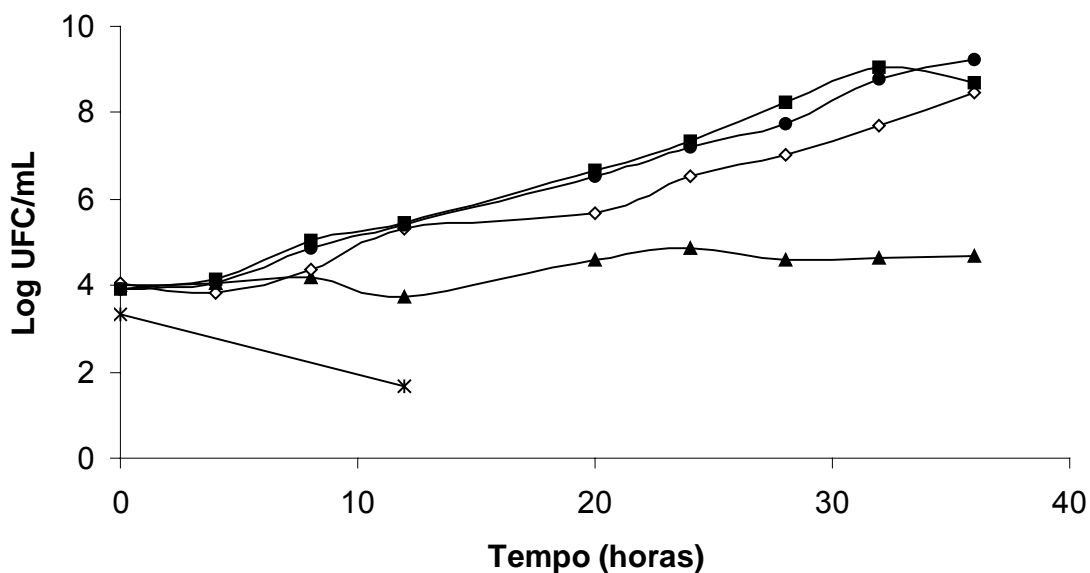


Figura 5. Logaritmo base 10 do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de *K. pneumoniae* em dieta enteral industrializada a temperatura de 15 °C em valores de pH 3,9 (*), 4,9 (▲), 5,9 (◇), 6,9 (■) e 7,9 (●).

O crescimento de *K. pneumoniae* a 15 °C mostra a necessidade de um controle efetivo da temperatura de refrigeração, que deve mantida entre 2 e 8 °C conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2000). Ao avaliar a temperatura de refrigeradores em cozinha hospitalar, OLIVEIRA e WAITZBERG (2000) registraram valores de 12 °C e os da enfermaria variaram de 9,6 a 13 °C. SILVA (2000) verificou que, em um estabelecimento hospitalar, a temperatura do refrigerador destinado à estocagem de dietas enterais era de 11 °C, enquanto em outro estabelecimento, as dietas eram mantidas a 18 °C. RAO e RAO (1983) afirmam que a maioria das espécies de bactérias de origem animal e humana são incapazes de crescer a 10 °C, entretanto, esses autores observaram que um considerável número de estirpes de *Klebsiella* cresceu a essa temperatura.

O crescimento de *K. pneumoniae* na ampla faixa de pH entre 4,9 e 7,9 (Figuras 3, 4 e 5) também evidencia o risco do crescimento bacteriano, caso as dietas estejam contaminadas. ARIAS et al. (1998) observaram que a maioria das dietas enterais tem pH em torno de 7,0 e que, essa condição, associada à temperatura em que as dietas são distribuídas e administradas são importantes fatores que favorecem a multiplicação dos microrganismos contaminantes.

Velocidades específicas de crescimento de *K. pneumoniae* maiores foram constatadas nas dietas com pH 5,9, 6,9 e 7,9 mantidas a 25 °C (Figura 6). A comparação dos resultados dos valores de velocidade específica de crescimento evidencia a semelhança do crescimento bacteriano a 15 e 20 °C além de sugerir que o pH ótimo para o crescimento dessa estirpe seja de em torno de 6,9 (Figura 6). Os valores de velocidade específica de crescimento de *K. pneumoniae* na dieta enteral a 25 °C variaram entre 0,43 a 0,94 h⁻¹ (Figura 6) e foram menores do que os valores de 1,19 a 1,28 h⁻¹ encontrados por SILVA (2000), para *S. enteritidis* em dietas industrializadas e artesanais.

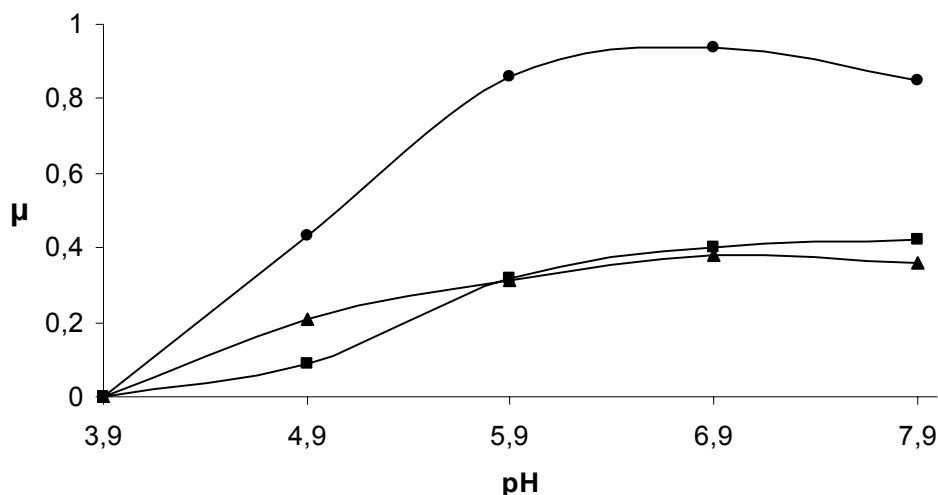


Figura 6: Velocidade específica de crescimento de *K. pneumoniae* em dieta enteral industrializada nas temperaturas de 15 °C (▲), 20 °C (■) e 25 °C (●) e em diferentes valores de pH.

Os tempos de geração de *K. pneumoniae* inoculada em dietas enterais com os valores de pH ajustados para 3,9 a 7,9 a 15, a 20 e 25 °C estão apresentados no Quadro 1. A 20 e 25 °C, *K. pneumoniae* inoculada em dieta enteral com pH 4,9 apresentou uma fase lag de aproximadamente 8 horas e 4 horas de incubação, respectivamente. COSTA et al. (1998) relatam que o tempo prolongado de administração (6 h) da dieta associada à manipulação inadequada promoveu a contaminação e o crescimento por *E. coli* e *Klebsiella* na dieta enteral. A exposição da fórmula enteral à temperatura ambiente por um período maior do que quatro horas de administração (ANDERTON, 1986) associada ao fator nutricional favorece a multiplicação de microrganismos.

Não foi observada fase lag quando *K. pneumoniae* foi cultivada em dieta enteral com o pH entre 5,9 e 7,9 a 20 e 25 °C (Quadro 1).

Quadro 1. Fase lag e tempo de geração de *K. pneumoniae* inoculadas em dietas enterais com diferentes valores de pH a 15, 20 a 25 °C.

pH	Fase Lag (horas)			Tempo de Geração (minutos)		
	15 °C	20 °C	25 °C	15 °C	20 °C	25 °C
4,9	13	8	8	191,30	419,24	95,98
5,9	8	nd	nd	131,69	127,90	47,88
6,9	4	nd	nd	107,16	103,24	44,19
7,9	4	nd	nd	112,70	98,83	48,84

nd: Não detectada

Após uma fase lag de, aproximadamente, 13 horas (Quadro 1) *K. pneumoniae* inoculada em dieta enteral com pH 4,9 a 15 °C cresceu menos de um ciclo logarítmico nas 36 horas de incubação. Muitos microrganismos patogênicos possuem resposta adaptativa a condições estressantes e, desta forma, estes microrganismos adquirem a capacidade de sobreviver em ambientes extremamente ácidos. A sobrevivência de bactérias em condições estressantes está intimamente ligada à expressão de fatores de virulência (MERREL e CAMILLI, 2002).

Estes resultados enfatizam a importância dos cuidados sanitários e do controle do tempo de preparo das dietas, associado ao controle da temperatura do produto final e à administração à temperatura ambiente, porque bactérias podem sobreviver e se multiplicar nas dietas enterais com baixos valores de pH e temperatura e alta osmolaridade.

4.3. Avaliação do crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais acrescida de prebióticos e nisina + EDTA.

O crescimento de *K. pneumoniae* a 25 °C não foi alterado pela adição de frutooligossacarídeos, inulina ou nisina + EDTA à dieta enteral El Diet[®] com pH ajustado para 5,0 (Figura 7) e 5,5 (Figura 8). Embora o frutooligossacarídeo e a inulina tenham favorecido o crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente (Figura 1) este efeito não foi observado quando da adição desses compostos prebióticos em dietas enterais, provavelmente em razão da composição mais rica em nutrientes dessas dietas. OVENSEN et al. (1991) afirmou que dietas enterais são formulações altamente nutritivas que apresentam carboidratos, nitrogênio, água e outros fatores em sua composição, que favorecem o crescimento da grande maioria dos microrganismos.

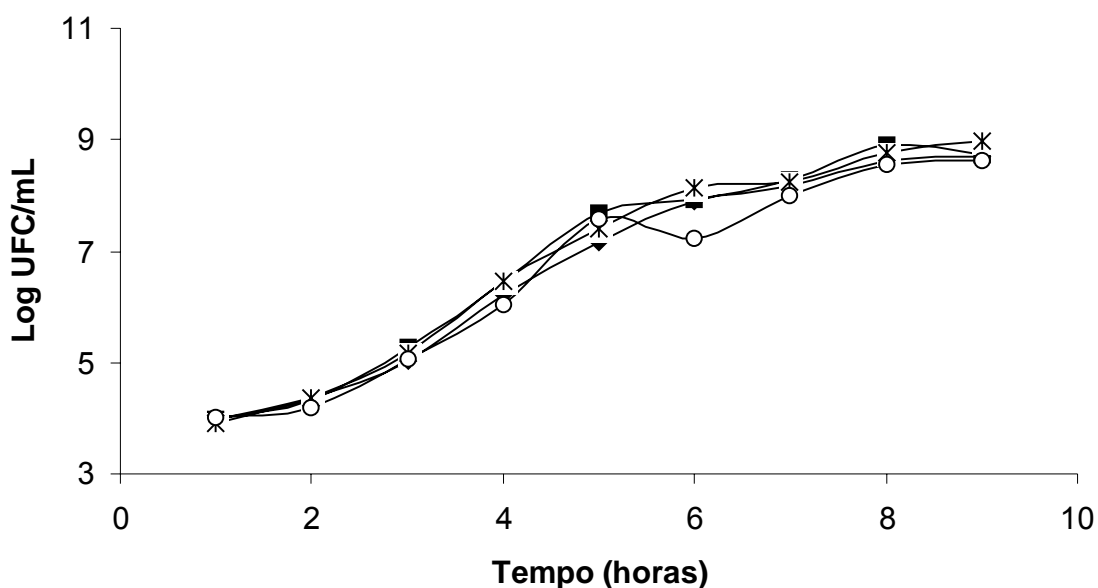


Figura 7. Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de *K. pneumoniae* em dieta enteral comercial (◆) e nas dietas acrescidas de frutooligossacarídeos (■), inulina (*), nisina + EDTA (o) em pH 5,0 a 25 °C.

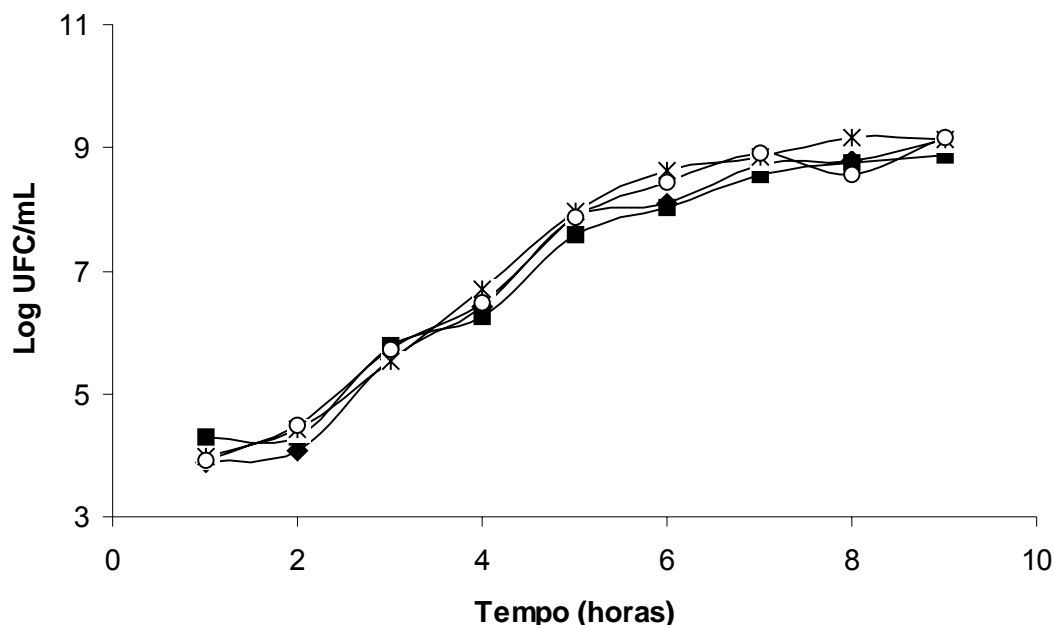


Figura 8. Logaritmo do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de *K. pneumoniae* em dieta enteral comercial (◆) e nas dietas acrescidas de frutooligossacarídeos (■), inulina (*), nisina + EDTA (○), em pH 5,5 a 25 °C.

A concentração de 3 mg L⁻¹ de nisina associada a 7,5 mg L⁻¹ de EDTA também não exerceu efeito inibidor no crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais com pH 5,0 e 5,5 (Figuras 7 e 8). Os resultados encontrados na literatura sobre a inibição de nisina associada a agentes quelantes sobre bactérias Gram-negativas são contraditórios. Segundo BOZIARIS e ADAMS (1999), a população de *E. coli* não foi afetada pela presença de 100 UI/mL de nisina em caldo de fermentação em pH 4,0 e 4,5. Entretanto, nisina + EDTA reduziu a população de células viáveis de *E. coli* O157:H7 em carne fresca refrigerada, de 0,8 ciclo logaritmo por cm² (CUTTER e SIRAGUSA, 1995b) e de 0,4 ciclo logaritmo por cm² (ZHANG e MUSTAPHA, 1999). STEVENS et al. (1991) demonstraram a redução de 3,2 a 6,9 ciclos logaritmos na contagem de células viáveis de bactérias Gram-negativas como: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Shigella flexneri* ATCC12022, *E. coli* O157:H7 HC 19386, *E. coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii*

ATCC 13048 e espécies de *Salmonella*, quando expostas a uma combinação de 50 µg/mL de nisina e 20 mM de EDTA por 60 minutos de tratamento a 37 °C e pH 6,9. A adição de 20 mmol⁻¹ de um agente quelante mais 1600 AU mL⁻¹ (Arbitrary Activity Unit per mL) (RAY, 1992) de nisina em pH 5,0 resultou em uma redução de 1,8 ciclos logarítmicos na contagem de células viáveis de *E. coli* (SGHEVED et al., 1996). Segundo esses autores, em pH 6,8 o efeito do agente quelante na sensibilização de *E. coli* e na ação de nisina foram mais pronunciadas, reduzindo até 5,5 ciclos logarítmicos na população de *E. coli*. O número de *Salmonella* e de *Pseudomonas* em pele de frango também foi reduzido em 0,7 e 1,3 ciclos logarítmicos respectivamente, pela combinação de 500 UI/mL de nisina, 20 mmol⁻¹ de EDTA e choque frio (BOZIARIS e ADAMS, 2000). CERRUTTI et al. (2001) em um estudo combinando o efeito de atividade de água, pH e nisina demonstraram que houve a redução de quatro a cinco ciclos logarítmicos no número de células viáveis de *E. coli* usando e 1000 a 1400 UI/mL de nisina em pH 5,5 a 6,5 e atividade de água variando de 0,97 a 0,98. LIU e HANSEN (1990) e CERUTTI et al. (2001) afirmaram que o efeito do pH na ação e estabilidade de nisina é determinante, com o pH alto a nisina torna-se inativa e desestabilizada e que tem, no pH 5,5 em meio de cultura, a sua atividade ótima.

Constatou-se que nos relatos de inibição de bactérias Gram-negativas por nisina, as concentrações do agente antimicrobiano usados foram geralmente elevadas. Mas, de acordo com *Food and Drug Administration* (FDA), a recomendação é de que a dose de ingestão diária máxima de nisina seja de 1,1 mg/dia (FDA, 2001). Esta concentração de nisina não parece ser suficiente para agir como antimicrobiano efetivo contra bactérias Gram-negativas contaminantes de dietas enterais, como verificado neste estudo. Além da concentração reduzida de nisina, outros fatores podem ter contribuído para a sua ineficácia. A presença de magnésio e cálcio na dieta enteral pode interferir na ação da nisina, uma vez que o agente quelante se liga a esses íons dissolvidos na solução e não naqueles presentes na membrana de lipopolissacarídeo da bactéria, mantendo-a intacta, e impedindo que a nisina penetre na célula e tenha o efeito antimicrobiano desejado (STEVENS et al., 1991, CUTTER e SIRAGUSA, 1995a).

O tempo de geração de *K. pneumoniae* em dieta enteral acrescida de prebióticos ou nisina + EDTA variou de 16,02 a 19,63 minutos e a velocidade específica de crescimento variou de 2,11 h⁻¹ a 2,59 h⁻¹ (Quadro 4).

Quadro2: Crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais acrescentadas de prebióticos e nisina mais EDTA.

	pH 5,0		pH 5,5	
Dieta El Diet	Tempo de geração (minutos)	Velocidade específica de crescimento (μ)	Tempo de geração (minutos)	Velocidade específica de crescimento (μ)
Controle	19,63	2,11	19,57	2,12
FOS	16,02	2,59	21,51	1,93
Inulina	18,42	2,25	16,64	2,49
Nisina + EDTA	16,07	2,58	18,70	2,22

4.4. Observação microscópica da cápsula de *K. pneumoniae*

Culturas de *K. pneumoniae* em caldo nutriente adicionado de fontes de carbono mais calóricas apresentaram alta viscosidade, após 48 horas de incubação a 37 °C. Entretanto, tal aspecto do crescimento não foi evidenciado durante o cultivo na presença de amido e dos poliálcoois; adonitol, dulcitol e xilitol. A presença de cápsula foi confirmada nas culturas que apresentaram viscosidade pela observação microscópica de preparações coradas com tinta nanquim.

A presença de cápsula foi também verificada em células de *K. pneumoniae* coletadas de dieta enteral El Diet[®] com o pH ajustado para valores de pH entre 3,9 a 6,9. Entretanto, não foi possível a visualização de cápsula nas células crescidas em dieta enteral com pH 7,9. A cápsula é considerada um fator de virulência importante, pois contribui para o patógeno superar as defesas imunológicas do

hospedeiro. CRYZ et al. (1984) demonstraram, em estudos com ratos, que a capacidade de *K. pneumoniae* em causar sepsis é dependente da quantidade de cápsula produzida. De acordo com MATATOV et al. (1999), o aspecto mucóide da colônia está relacionado com a produção de cápsula, que é um fator de virulência essencial para que *Klebsiella* possa superar o sistema imune do hospedeiro (SIMOONS- SMITH et al., 1986).

O crescimento em condições adversas como pH, temperatura, ausência de nutrientes, entre outros, pode resultar na formação de cápsula. WAI et al. (1998) também verificaram que *Vibrio cholerae* crescendo em um ambiente de estresses osmótico e oxidativo apresentou mudanças fenotípicas e um aumento significativo na produção de cápsula, promovendo a formação de biofilmes e resistência da bactéria a esses fatores estressantes.

Não foi possível a visualização da cápsula em células de *K. pneumoniae* cultivadas em dieta enteral El Diet[®] acrescidas de soluções de FOS, inulina ou nisina + EDTA, com pH 5,0. Entretanto, somente na dieta El Diet[®] que foi usada como controle, células de *K. pneumoniae* apresentaram a capacidade de produzir cápsula.

Os resultados permitem sugerir que a formulação das dietas enterais pode criar condições que reduzem a virulência de patógenos, como a inibição da produção de cápsula.

4.5. Determinação da acidez titulável

A acidez titulável expressa em porcentagem de ácido láctico da dieta comercial El Diet variou, inicialmente, entre 0,94 a 1,22 e após o crescimento de *K. pneumoniae* foram encontrados valores de 0,80 após a incubação por 48 horas a 15 °C, 0,76 a 20 °C e 0,66 a 25 °C.

Nas dietas enterais acrescidas de prebióticos ou nisina + EDTA, os valores de acidez expressa em porcentagem de ácido láctico foram de 0,63 a 0,69 para as dietas com pH corrigido para 5,0 e 5,5, respectivamente, no início da incubação e

0,54 e 0,69 no final de 48 horas de incubação. Todos os resultados encontrados de acidez titulável, expressos em percentagem de ácido láctico, após 48 horas de incubação foram menores do que os resultados obtidos no início do experimento. Mesmo sendo membro da família das *Enterobacteriaceae*, isto é, bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, tipicamente fermentativos, os resultados de acidez titulável indicam pouca produção de ácidos por *Klebsiella*. Essa característica pode ser confirmada pelo resultado negativo do teste Vermelho de Metila (VM) da série bioquímica IMViC para *K. pneumoniae* (ORSKOV, 1984).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O crescimento de *K. pneumoniae* estirpe P15 foi avaliado a 37 °C em caldo nutriente acrescentado de fontes de carbono diferentes. Também foi avaliado o crescimento desse patógeno oportunista em dietas enterais estocadas a 15, 20 e 25 °C e com valores de pH entre 3,9 e 7,9 e naquelas adicionadas dos prebióticos frutooligossacarídeo e inulina ou do antimicrobiano nisina acrescido de EDTA.

O crescimento em caldo nutriente adicionado de fontes de carbono como adonitol, amido, dulcitol e xilitol resultou em uma densidade ótica menor da cultura bacteriana ao final de 11 horas de incubação do que as observadas quando na presença de fontes de carbono de maior valor calórico como glicose, sacarose, maltodextrina e maltodextrina associada a ácidos graxos de cadeia média.

Nas dietas enterais com o pH ajustado para valores entre 4,9 e 7,9, a população final de *K. pneumoniae* alcançou 10^7 a 10^9 UFC mL⁻¹ a 25 °C, correspondendo a um aumento de três a cinco ciclos logarítmicos. Este resultado indica o risco do aumento da população de contaminantes nas dietas enterais, mesmo que a contaminação inicial tenha sido por um pequeno número de células viáveis. A incubação das dietas inoculadas a temperaturas de 15 e 20 °C resultou em aumentos de três a cinco ciclos logarítmicos quando o pH variou de 5,9 a 7,9. Não foi observado o crescimento de *K. pneumoniae* em dietas enterais com pH 3,9. Embora esse valor de pH tenha sido efetivo para impedir a multiplicação de *K.*

pneumoniae, não seria recomendado para dietas enterais, pois a sua administração diretamente nas vias entéricas poderia promover a irritação da mucosa intestinal.

Os valores de velocidade específica do crescimento de *K. pneumoniae* na dieta enteral a 25 °C variaram de 0,43 a 0,94 h⁻¹ enquanto a 15 e 20 °C estes valores variaram de 0,42 a 0,09 h⁻¹.

Embora a inulina e os frutooligossacarídeos tenham favorecido o crescimento de *K. pneumoniae* em caldo nutriente, este efeito não foi observado quando da adição desses prebióticos em dietas enterais, provavelmente em razão da composição mais rica em nutrientes dessas dietas.

A adição de 3,0 mg L⁻¹ do antimicrobiano nisina juntamente com o agente quelante EDTA não promoveu a inibição do crescimento de *K. pneumoniae*. A baixa concentração de nisina adicionada e provavelmente, a abundância de minerais encontradas na composição de dietas enterais, podem ter interferido com a ação quelante do EDTA contribuindo para a ineficácia de inibição. O tempo de geração de *K. pneumoniae* em dietas adicionadas dos prebióticos e de nisina + EDTA variou de 16 a 22 minutos em pH 5,0 e 5,5.

A presença de cápsula, um fator de virulência de *K. pneumoniae*, não foi verificada em culturas em caldo nutriente adicionado de adonitol, amido, dulcitol e xilitol. Também não foi constatada a presença de cápsula nas células cultivadas em dieta enteral com pH 7,9 ou quando as dietas foram acrescidas de frutooligossacarídeo, inulina ou nisina + EDTA. Em dietas enterais com pH ajustado entre 3,9 e 6,9 a presença de cápsula foi verificada em células de *K. pneumoniae*.

A acidez titulável expressa em ácido láctico da dieta comercial El Diet[®] variou inicialmente, entre 0,94 a 1,22 % e após o crescimento de *K. pneumoniae* foram encontrados valores de 0,80 % após a incubação por 48 horas a 15 °C, 0,76 % a 20 °C e 0,66 % a 25 °C. Nas dietas enterais acrescidas de prebióticos ou nisina + EDTA, os valores de acidez expressa em porcentagem de ácido láctico foram de 0,63 a 0,69 % para as dietas com pH corrigido para 5,0 e 5,5,

respectivamente, no início da incubação e 0,69 e 0,54 % no final de 48 horas de incubação.

Embora os resultados obtidos demonstrem que é possível reduzir a velocidade de crescimento de *K. pneumoniae* e, provavelmente de outros contaminantes com a modificação da fonte de carbono e pH das dietas enterais é preciso salientar que a manutenção da inocuidade das dietas enterais depende essencialmente das condições higiênico sanitárias mantidas durante todo o processo de preparo. Além disso, um controle rigoroso deve ser exercido sobre as condições de armazenamento e transporte refrigerados e sobre o tempo de administração das dietas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Health implication of dietary fiber. **Journal of American Diet Association**, v. 97: p.1157-59, 1997.

ANDERTON, A. Microbiological aspects of the preparations and administration of naso-gastric and naso-enteric tube feeds in hospitals - A Review. **Human Nutrition**, v. 37A, p.426-440, 1983.

ANDERTON, A. The potential of *Escherichia coli* in enteral feeds to cause food poisoning: study under simulated ward conditions. **Journal of Hospital Infection**, v. 5, p.155-163, 1984.

ANDERTON, A. Growth of bacteria in enteral feeding solutions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n.1, p.63-68, 1985.

ANDERTON, A. Microbial quality of products used in enteral feeds. **Journal of Hospital Infection**, v. 7, p.68-73, 1986.

ANDERTON, A., HOWARD, J.P., SCOTT, D.W. Microbial control in enteral feeding. Summary of a guidance document prepared on behalf of the Committee of the parenteral and enteral nutrition group of the British dietetic association. **Human Nutrition Applied**, v. 40A, p.163-167, 1986.

ANDERTON, A. Bacterial contamination of enteral feeds and feeding systems. **Clinical Nutrition**, v. 12, p.S16-32, 1993.

ANDRADE, N. J., MACÊDO, J. A. B. *Higienização na Indústria de Alimentos*. Nº 163, São Paulo, Ed. Varela, 1995.

ARIAS, M.A., MONGE, R., RODRÍGUEZ, J. Presença de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Listeria sp.* em fórmulas enterales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrition**, v. 48, n. 1, p.68-70, 1998.

BASTOW, M. D., GREAVES, P., ALLISON, S. P. Microbial contamination of enteral feeds. **Human Nutrition Applied Nutrition**, v. 36A, p.213-217, 1982.

BENGMARK, S., LORENZO, A. G., CULEBRAS, J. M. Use of pro, pre and synbiotics in the ICU –Future options. **Nutricion Hospitalaria**, v. 16, n 6, p.239-256, 2001.

BOUHNİK, T., VAHEDI, K., ACHOUR, L., A., ATTAR, SAFATI, J., POCHART, P., MARTEAU, P., FLOURIÉ, B., BORNET, F. e RAMBAUD, J.C. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increase fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v. 129: p.113-116, 1999.

BORGES, V. C: Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG D. L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. ed. 3º, São Paulo, Atheneu, p.1495-1509, 2000.

BOZIARIS, I. S., ADAMS, M. R. Effect of chelatores and nisin produced *in situ* on inhibition and inactivation of Gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p.105-113, 1999.

BOZIARIS, I. S., ADAMS, M. R. Transient sensitivity to nisin in cold-shock Gram negatives. **Letters In Applied of Microbiology**, v. 31, p.233-237, 2000.

BRASIL, Leis, decretos. Resolução nº 730/80, de 7 de julho de 1980 – Regulamento técnico que aprova xilitol como produto dietético. Brasília, Ministério da Saúde, 1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Primeira pesquisa brasileira das infecções hospitalares. **Revista de Controle de Infecção Hospitalar**, p. 47, 1995

BRASIL, Leis, decretos. Resolução nº 63, de 6 de julho de 2000 – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade para alimentos para nutrição enteral. Brasília, Ministério da Saúde, 2000.

BRASIL, Leis, decretos. Resolução -RDC nº 33, de 9 de março de 2001 – Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 12: Sopas e Caldos, Brasília, Ministério da Saúde, 2001.

BURNS, P. E., JAIRATH, N. Diarrhea and the patient receiving enteral feedings: Disponível em multifactorial problem <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?uid=7704134&form=6&db=m&Dopt=b>>. Acessado em 15/07/99.

BUSSY, V., MARECHAL, F., NASCA, S. Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, p.552- 557, 1992.

CADWELL, D. R., *Microbial physiology and metabolism*. 2^o ed., p.403, 2000.

CASE, R. A, BRADLEY, R. L., WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: RICHARDSON, G. H. *Standard methods for the examination of dairy products*. 15 th edition, American Public Health Association, Washington, D.C., p.327-404, 1985.

CASEWELL, M., PHILLIPS, I. Food as a source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care unit patients. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p.845-849, 1978.

CASEWELL, M., PHILLIPS, M. COOPER, J. E. WEBSTER, M. Enteral feeds contaminated with *Enterobacter cloacae* as a cause of septicemia. **British Medical Journal**, v. 282, p.937, 1981.

CERRUTTI P., TEREbiznik M. R., HUERGO M. S., JAGUS, R. e PILOsoF A. M. R. Combined effect of water activity and pH on the inhibition of *Escherichia coli* by nisin. **Journal of Food Protection**, v. 64, n 10, p.1510-1514, 2001.

COOKE, E. M., SAZEGAR, T., EDMONSONA.S.BRAYSON, J.C. e HALL, D. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients **Journal Hygienic**, v. 84, p.97-101, 1980.

COSTA, G. P., SILVA, M. L. T., FERRINI, M. T., BOLLONI. A., MORENA J. C. Jr., COPPINI L. Z., AANHOLT, D., BORGES, V. C., CUSAK. S. e WAITZBERG, D. L.. Estudo comparativo da contaminação microbiana das dietas enterais em sistemas aberto e fechado. **Jornal Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral**, p.180-188, 1998.

CROCKER, K. S., KREY, S. H., MARKOVIC, M. STEFFEE, W. P. Microbial growth in clinically used enteral delivery systems. **American Journal of Infection Control**, v. 14, p.250-256, 1996.

CRYZ, S. J. FÜRER, F., GERMANIER R. Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: Role of capsular polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 43, n 1, p.440-441, 1984.

CUMMINGS, J. H., MACFARLANE, G. T., ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.415s-420s, 2001.

CUTTER ,C. N; SIRAGUSA, G. R. Population reductions of Gram negative pathogens following treatments with nisin and chelatores under various conditions, **Journal of Food Protection**, v. 58, n 9, p.977- 983, 1995a.

CUTTER, C. N; SIRAGUSA, G. R. Treatments with nisin and chelatores to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. **Journal of Food Protection**, v. 57, p.1028-1030, 1995b.

DAVIS, T.J. e MATSEN, J. M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. **Journal of Infections Diseases**, v. 130, p.402-405, 1974.

DELVES-BROUGHTON J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technology**, v. 44, n. 11, p.100- 113, 1990.

DELVES-BROUGHTON J., WILLIAMS G. C., WILKINSON S. The use of bacteriocin, nisin as a preservative in pasteurized liquid whole eggs. **Letters Applied of Microbiology**, v. 15 p.33-136, 1992.

DOMENICO, P., JOHANSON, W. G. Jr., STRAUS, D. C. Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection Immunity**, v. 37, p.327-335, 1982.

DOROTHY, C. B. Ed. D., DAVIDSON L. J. M. N. e FLOURNOY D. J. Microorganisms and diarrhea in enterally fed intensive care unit patients. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n 6, p.622-628, 1990.

DU MOLIN, G. C., PATERSON, D.G., HEDLEY-WHITE, J. & LISBON, A. Aspiration of gastric bacteria in antacid treated patients: a frequent cause of post-operative colonization of the airway. **Lancet**, v. 1, p.242, 1982.

EBIHARA, K., NAKAMOTO, Y. Comparative effects of water-soluble and insoluble dietary fiber on bowel functions in rats fed a liquid elemental diet. **Nutrition Research**, v. 18, n 5, p.883-891, 1998.

EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technology**, v. 32, p.28-32, 1978.

FELDMAN, C., SMITH, LEVY C., GINSBURG, MILLER P., KOORNHOF H. J. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia at an urban general hospital. **Journal of Infection**, v. 20, p.21-31, 1990.

Food and Drug Administration FDA -Federal Register Nisin preparation affirmation of GRAS status as direct human food ingredients. Fed. Regist. 53 11247-11251, 1988.

Food and Drug Administration FDA/CFSAN/OPA: Agency response letter GRAS notice N^o GRN 000065, 2001. Disponível em <<http://file://A:/FDA-CFSAN-OPA> Agency Response Letter GRAS notice N_o _GRN000065.htm acessado em 15/07/2002>

GIBBS, B. M., HURST, A. Limitations of nisin as a preservative in non-dairy foods, p.151-165. In N. Molis (ed.) microbial inhibitors in food. Almquist Wiskell, 1991.

GIBSON, G. R., WANG, X. Inhibitory effects of bifidobacteria on the other colonic bacteria. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 77, p.412-420, 1994a.

GIBSON, G. R., WANG, X. Bifidogenic properties of different types of fructooligosacárideos. **Food Microbiology**, v. 11, p.491-498, 1994b.

GIBSON, G.R., BEATTY, E. R., WANG, X., e CUMMINNGS, J. H.. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, p.975-982, 1995.

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

GIBSON, G.R., SAAVEDRA, J. M., MACFARLANE, S e MACFARLANE G. T. Probiotics and intestinal infections. In: *Probiotics: Therapeutic and other beneficial effects*. ed. Fuller R. Chapman & Hall, London, UK, p.10-39, 1997.

GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **Journal of Nutrition**, v. 129, p.438s-1441s, 1999.

GILL, K., GILL, P. Contaminated enteral feeds. **British Medical Journal**, p.282; 1981.

KALCHAYANAND, N., HANLIN, M. B. & B. RAY. Sublethal injury makes Gram negative and resisteant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. **Letters In Applied of Microbiology**, v. 15, p.239-243, 1992.

KAMAGUCHI, M., TASHIRO, Y., ADACHI, T., TAMURA, Z. Changes on intestinal condition, fecal microflora and composition of rectal gas after administration of fructooligossacarídeos and lactulose at different doses. **Bifidobacteria Microflora**, v. 13, p.57-68, 1993.

KAWASE, K. Effects of nutrients on the intestinal microflora of infants. **Journal Dairy of Food Science**, v. 31, p.A241-A243, 1982.

HANSEN, D. S., GOTTSCHAU, A. e KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **Journal Hospital of Infection**, v. 38, p.119-132, 1998.

HARRIGAN, W. F. e McCANGE, M. E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press, New York USA, p.451, 1976.

HERIGSTAD, B., HAMILTON, M., HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 44, p.121-129, 2001.

HOLZAPFEL, H. W., SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, V. 35, p.109-116, 2002.

HURST, A. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. v. 27, p.85-123, 1981.

HYVÖNEM, L., KOIVISTOINEN, P. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p.373-402, 1982.

IDENO, K. T. Enteral nutrition In: Gottschlich M M, Matarese LE ed. *Nutrition Support Dietetics*, 2 nd edn Silver Spring, USA: **American Society of Parenteral and Enteral Nutrition**, p.71-104, 1993.

JAY, J.M. *Modern food microbiology*. AVI. New York, ed. 4^o, p.290-293, 1986.

LEE, C. H. e HODGKISS, I. J. The effect of poor handling procedures on enteral feeding systems in Hong Kong. **Journal of Hospital Infection**, v. 42, p.119-123, 1999.

LEVY, J., LAETHEM, J. V., VERHAEGEN, G., PERPETE, C., H., BUTZLER, J., P. e WENZEL R. P. Contaminated enteral nutrition solutions as a cause of nosocomital bloodstream infection: a study plasmid fingerprint. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 3, p.228-234, 1989.

LIU, W., HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n 8, p.2551-2558, 1990.

MÄKINEN, K. K., SÖDERKING, E. Effects of xylitol on some food-spoilage microorganisms. **Journal of Food Science**, v. 46, n 3, p.950-951, 1981.

MÄKINEN, K. K. Latest dental studies on xylitol and mechanism of action limitation, In: Grenby TH, ed. *Progress in sweeteners*. London: Elsevier, p.331-62, 1989.

MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol ? **Medical Hypotheses**, v. 54, n 4, p.603-13, 2000.

MATATOV, et al. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **Microbiology Letters**, v. 179, p.123-130, 1999.

MITNE, C. Preparações não industrializadas para nutrição enteral.. In: WAITZBERG D. L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. ed. 3º, São Paulo, Atheneu, p.1495-1509, 2000.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p.263-267, 1990.

MOLIS C., FLOURIÉ B., OURANE F., GAILING, M F., LARTIGUE, S. GUILBERT, A., BORNET, F. e GALMICHE, J. P. Digestion, excretion and value of fructooligosaccharies in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p.324-8, 1996.

MONTGOMERIC, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* and hospital associated infections. **Review Infection Diseases**, v.1, p.736, 1979.

NATRAJAN, N, SHELDON, B.W. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-basic films containing a nisin formulation **Journal of Food Protection**, v. 63, n 9, p.1268-1272, 2000.

NAVAJAS, M. F., CAHACON, D. J., SOLVAS, J., F, VARGAS, R., G. Bacterial contamination of enteral feeds as a possible risk of nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 21, p.111-120, 1992.

Nestlé Fibras em nutrição enteral., 2002. Disponível em: <http://nutricaoclinica.nestle.com.br/publicacoes/fibrasnutricaoenteral/index.htm>. Acessado em: 15 julho 2002.

OLIVEIRA, M. H., BONELLI, R., AIDOO K. E. e BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. **Nutrition**, v. 16, n 9, p.729-733, 2000.

ORSKOV, I. Genus *Klebsiella* In: K. N. R., HOLT J. G., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. Williams & Wilkins, v. 1, p.461-465, 1984.

OVESEN L., HANSEN E. W., ALLINGSTRUP L., ADERSEN, M., LANGBALLE, K. FROKJAER, S.. Bacterial contamination and growth in two defined formula diets of different pH. **Clinical Nutrition**, v. 10, p.114-9, 1991.

OKUMA, T, NAKAMURA, M., TOTAKE, H. e FUKUNAGA, Y., Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea. **Nutrition**, v. 16, p.719-722, 2000.

PELCZAR JUNIOR, M. J. CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Nosocomial infections. *microbiology: concepts and applications*. New York: Mc Graw-Hill, P.869, 1993.

PEREIRA, S.C.L., ARAÚJO, E. F.,MEZENCIO, J. M. S. e VANETTI M.C.D. et al. **Caracterização de *Klebsiella* sp. Isolada de dietas enterais**, 2000, Bueno Aires, **Anais**. Bueno Aires: Secretaría Científica/Técnica. MICROAL, p. 29, 2000.

PEREIRA, S.C.L. **Caracterização molecular e de fatores de virulência de *Klebsiella* sp. isoladas de dietas enterais**, Viçosa, MG: UFV, 106f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2001.

PODSCHUN, R. FISCHER, A. e ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expresión of virulence factors. **Applied and Environment Microbiology**, v. 67, p.3325-3327, 2001.

POTTECHER, B, GOETC, M. L., JACQUEMAIRE, M. A., REEB, E., LAVILLAUREIX, J. et al. Enterocolites infectieuses chez des maladies de reanimation alimentes par sond nasogastrique. **Annual Anesthesiology of France**, v. 20, n 6-7, p.595-602, 1979.

RAMSEIER, H. R. The mode of action of nisin on *Clostridium butyricun*. **Archived Für Mikrobiologie**, v. 37, p.57, 1960.

RAO, D.V., RAO, K. R. G. Some characteristics of *Klebsiella* strains isolated from foods and water. **Journal of Food Science and Technology**, v. 20, p.269-272, 1983.

RAY, B. Control by antimicrobial preservatives. In: RAY B. *Fundamental food microbiology*. Ed. CRC Press Inc. Boca Raton. p.437, 1996.

RAYERS, N., HANSEN, S., SEEHOFER, D., MÜLLER, A. R., SERKE, S., BENMARK, S., NEUHAUS, P. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. **Nutrition**, v. 18, n. 7/8, p.609-615, 2002.

RASIC, J. L. The role of airy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health. **European Dairy Journal**, v. 4, p.80-88, 1983.

RENNIE, R. P., ANDERSON, C. M., WENSLEY, B. G., ALBRITTON, W. L. e MAHONY, D. E. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.216- 219, 1990.

ROBERFROID M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Review of Food Science Nutrition**, v. 33, p.103-148, 1993.

ROBERFROID, M. B., DELZENNE, N. M.: Dietary fructans. **Annual Revision Nutrition**, v. 18, p.117-143, 1998.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v 130, p.396s-402s, 2000.

ROWAN N. J., ANDERSON J. G. Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae. **Applied and Environment Microbiology**, v. 63, n. 3, p.1182-1184, 1996.

SABOTA, J. M., HOPPES, W. L., ZIEGLER, J. R., DuPONT, H., MATHEWSON, J. e RUTECKI, G. W. A new variant of food poisoning: Enteroinvasive *Klebsiella*

pneumoniae and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n 1, p.118-119, 1998.

SCHOOTER, R. A., FAIERS, M.C., COOKE, E. M. BREADEN, A. L. e O' FARRELL, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospital, canteens and school. **Lancet**, v. 2, p.390 -392, 1971.

SGHVED, F., PIERSON, M.D., JUVEN, B. J. Sensitization of *Escherichia coli* to nisin by maltol and ethyl maltol. **Letters In Applied Microbiology**, v. 22, p.189-191, 1996.

SILVA, R. R. **Crescimento de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* em dietas enterais**, Viçosa, MG: UFV, 54f., Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SILK, D. B. A. Fibre and enteral nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 12; p.S106-113, 1993.

SIMMONS-SMITH, A. M., VERWEIJI-VAN VUGHT, A. M. J. J. e MACLAREN D. M. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 21, p.33-137, 1986.

STANEK, G., HIRSCHL, A., LOCHS, H. I. E EGGER, T. P. Growth of various bacteria and yeasts in a peptide and an elemental diet. **Journal of Hospital Infection**, v. 4, p.51-56, 1983.

STEVENS, K. A., SHELDON, B.W., KLAPES, N. A. e KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied and Environment Microbiology**, v 57, n 12, p.3613-3615, 1991.

THURN, J., CROSSLEY, K., GERDTS, A., MAKI, M. e JOHNSON J. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. **Journal of Enteric Infection**, v. 15, p.203-217, 1990.

TOMÁS, J. M., BENEDÍ, V. J., CIUARANA, B., JOFRE, J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v. 54, n 1, p.85-89, 1986.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, p.61-64, 1994.

WAI, S. N., MIZUNOE, Y., TADAKE, A., KAWABATA, S. I. e YOSHIDA, S. I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. **Applied and Environment Microbiology**, v. 64, n 10, p.3648-3655, 1998.

WASHÜTTL, J., RIEDERER, P., BANVHER, E. A. Qualitative and quantitative study of sugar-alcohols in several foods. **Journal of Food Science**, v. 38, p.1262-1263, 1973.

WEENK, G., UNEN, E. V., MEEUWISSE, J., ESS, I. V., HULST, J. van der Assessment of the microbiological safety of enteral feeds when used with a prolonged feeding time. **Burns**, v. 21, n 21, p.98-101, 1995.

WILLIAMS P., LAMBERT P. A. HAIGH C. G. e BROWN, M. R. W. The influence of the O and K antigens of *Klebsiella aerogenes* on surface hydrophobicity and susceptibility to phagocytosis and antimicrobial agents. **Journal of Medical Microbiology**, v. 21, p.125-132, 1986.

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xilitol. *Advances in Food Research*, v. 25, p.159-178, 1979.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides- Occurrence preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p.107-117, 1996.

ZABNER, J, SELLER, M. P., LAUNSPACH J. L., KARP, P. H., KEARNEY, W. R., DWIGHT, C. L., SMITH, J. J. e WELSH, M. J. The osmolyte xilitol reduces the SALT

concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 97, n 21, p.11615-11619, 2000.

ZHANG, S., MUSTAPHA, A. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. **Journal of Food Protection**, v. 62, n 10, p.1123-1127, 1999.