

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

Tania Cristina Sumita

Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas

Lorena
2007

Tania Cristina Sumita

Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Lorena
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Sumita, Tania Cristina

Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas / Tania Cristina Sumita ; orientador Ismael Maciel de Mancilha. -- 2007

93 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Microbiologia sanitária 2. *Lactobacillus* 3. Probióticos 4. NaCl 5. pH 6. Temperatura e Sais biliares. I. Título.

579.63 - CDU

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

Aos meus familiares, que, mesmo com todas as adversidades da vida hoje são vencedores, e me fizeram acreditar na vitória que motiva hoje e sempre, à nunca desistir.

Ao Rogério, pelo amor, paciência, compreensão e dedicação durante o período para a realização desta fase da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as alegrias e tristezas que de forma indiscutível me auxiliaram na execução desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela idéia inicial deste trabalho, pela orientação, pelos conselhos, repreensões, e pela confiança durante a realização deste trabalho.

À Universidade de Taubaté pelo apoio e incentivo.

Ao Instituto Básico de Biociências da UNITAU pelo apoio e compreensão.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Microbiologia da UNITAU, pelo incentivo, apoio, compreensão e imenso carinho.

Ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biasi – Volta Redonda – RJ, por ceder gentilmente os microrganismos de sua coleção para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz de Taubaté por fornecer uma cepa de *Salmonella typhi* para o teste de antagonismo.

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório e do Departamento de Biotecnologia.

À EMBRARAD, que gentilmente esterilizou o material utilizado por radiação gama com cobalto 60.

À minha família, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Ao Rogério, companheiro de todas as horas, pelo amor, confiança, compreensão, incentivo e preciosas sugestões.

RESUMO

SUMITA, T. C. **Caracterização de cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto à propriedade probióticas**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

A má alimentação, o stress e o uso excessivo de antibióticos comum nos dias de hoje, levam a um desequilíbrio da microbiota intestinal, facilitando assim a invasão pelos patógenos que causam distúrbios intestinais. Algumas espécies de microrganismos da microbiota trazem algum benefício ao seu hospedeiro, devido às suas características estruturais e metabólicas. Estes podem ser adicionados aos alimentos com o objetivo de ajustar a microbiota desequilibrada, e são denominados de probióticos. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são habitantes naturais do intestino humano, onde favorecem a digestão e a absorção dos nutrientes, além de combater os microrganismos invasores e estimular o sistema imunológico, porém, a variabilidade das características benéficas destes microrganismos faz com que seja necessária a seleção de cepas específicas que possuam propriedades probióticas pronunciadas para serem incorporadas aos alimentos funcionais. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar 40 isolados de *Lactobacillus* originados de fezes humanas pertencentes à Coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biasi – Volta Redonda – RJ, quanto às propriedades probióticas. Foram realizados numa primeira etapa, testes a fim de detectar a produção de ácido láctico, verificar a resistência às diferentes concentrações de sais biliares, cloreto de sódio e crescimento em diferentes condições de temperatura e pH.. As sete cepas selecionadas nesta primeira etapa foram posteriormente avaliadas quanto ao efeito antagônico sobre patógenos como *Salmonella tiphy*, *Escherichia coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*. As duas cepas que apresentaram efeito antagônico mais pronunciado foram, então, testadas quanto à manutenção da viabilidade celular sob condições de estocagem em leite reconstituído a 4 °C durante 30 dias sendo mantidos os níveis de células viáveis entre 10^6 e 10^7 UFC/ml neste período. Para efeito de comparação empregou-se como referência a cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2B20.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, Probiótico, NaCl, pH, Temperatura e Sais biliares.

ABSTRACT

SUMITA, T. C. **Characterization of *Lactobacillus* strains isolated from human feces, concerning to their probiotic properties.** 2007. 91f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo

In the present work 40 isolated *Lactobacillus* strains originated from human feces, which belong to the Collection of the Laboratory of Microbiology of the Centro Universitário Geraldo di Biasi – Volta Redonda - RJ, were characterized concerning to their probiotic properties. In a first stage, tests were undertaken in order to detect the production of lactic acid, verify the resistance to the different concentrations of bile salt, sodium chloride and growth in different conditions of temperature and pH. From this stage, the microorganisms capable to survive to the conditions of the digestive treatment had been selected, being able to act in the thick intestine. The seven strains selected in this first stage later had been evaluated about the antagonistic effect on pathogens species such as *Salmonella tiphy*, *Escherichia coli* 0157: H7 and *Listeria monocytogenes*. The two strains which showed a strong antagonistic effect had been, then, tested about the cellular viability maintenance in storage condition in reconstituted milk at 4°C during 30 days and had kept the levels of viable cells between 10^6 and 10^7 CFU/mL in this period. As reference for all the tests had been used strain of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2B20.

Key-words: Lactobacillus, Probiotics, NaCl, pH, Temperature and bile salt.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Probióticos: Histórico e Conceitos.....	11
2.2. Probióticos vs Microbiota Intestinal.....	12
2.3. Mecanismos de Ação	15
2.3.1. Adesão à mucosa e estimulação do sistema imunológico.....	16
2.3.2. Competição e produção de compostos antimicrobianos.....	22
2.4. Aplicações industriais.....	24
2.5. Critérios para seleção de microrganismos probióticos	25
2.5.1. Produção de ácido Lático.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Microrganismos e Manutenção	29
3.2. Resistência ao cloreto de sódio, sais biliares, temperatura, pH e produção de ácido láctico	30
3.2.1. Resistência ao cloreto de sódio pelas cepas de <i>Lactobacillus</i>	30
3.2.2. Resistência a sais biliares pelas cepas de <i>Lactobacillus</i>	30
3.2.3. Crescimento das cepas de <i>Lactobacillus</i> em diferentes temperaturas.....	31
3.2.4. Crescimento das cepas de <i>Lactobacillus</i> em diferentes condições de pH	32
3.2.5. Produção de ácido láctico pelas cepas de <i>Lactobacillus</i>	33
3.2.6. Correlação entre UFC/mL e absorbância a 600 nm	34
3.3. Efeito antagonico das cepas de <i>Lactobacillus</i> sobre as cepas patogênicas.....	35
3.4 Determinação da viabilidade celular das cepas de <i>Lactobacillus</i> em condições de estocagem.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Avaliação da resistência ao Cloreto de Sódio.....	37
4.2. Avaliação da resistência a sais biliares.....	40
4.3. Avaliação do crescimento de <i>Lactobacillus</i> em diferentes temperaturas.....	43
4.4. Avaliação do crescimento das cepas de <i>Lactobacillus</i> em diferentes condições de pH.....	45
4.6. Produção de ácido láctico.....	48
4.7. Seleção das cepas de <i>Lactobacillus</i>	50
4.8. Efeito antagonico das cepas de <i>Lactobacillus</i> sobre cepas patogênicas.....	52
4.9. Viabilidade celular das cepas de <i>Lactobacillus</i>	54
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	59
APÊNDICE	69
APÊNDICE A. AVALIAÇÃO COM CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	69
APÊNDICE B. AVALIAÇÃO COM CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES	77

APÊNDICE C. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA	85
APÊNDICE D. AVALIAÇÃO DE pH.....	88
APÊNDICE E. CURVAS DE CALIBRAÇÃO	92

1. INTRODUÇÃO

O papel preliminar do trato gastrointestinal (TGI) é digerir e absorver nutrientes para suprir as exigências metabólicas necessárias para o crescimento e o desenvolvimento humano. Além disso, a mucosa intestinal fornece uma defesa protetora do indivíduo contra a presença constante de antígenos dos encontrados nos alimentos e de microrganismos no lúmen intestinal. A má alimentação, o stress e o uso excessivo de antibióticos comum nos dias de hoje, levam a um desequilíbrio da microbiota intestinal, facilitando assim a invasão pelos patógenos podendo causar distúrbios intestinais.

A microbiota intestinal constitui de um nicho ecológico extremamente complexo que, apesar dos numerosos esforços de pesquisadores, sua completa definição em termos de microbiota é uma tarefa extremamente difícil. Estima-se que a microbiota intestinal possua cerca de 500 espécies diferentes de microrganismos (ISOLAURI, 2001).

Existem espécies de microrganismos que apresentam elevada capacidade de aderência ao muco intestinal, que são benéficos ao hospedeiro, denominados probióticos. Estes microrganismos são comercializados com objetivos profiláticos, terapêuticos e como promotores de crescimento.

A principal função dos probióticos é a competição ecológica por sítios de adesão com os microrganismos enteropatógenos, constituindo a primeira linha de defesa ao nível intestinal. Estes impedem que espécies patogênicas colonizem o epitélio intestinal, os movimentos peristálticos juntamente com algumas bacteriocinas e ácidos orgânicos produzidos pelos probióticos ajudam a eliminá-los.

Para a seleção de cepas que apresentam propriedade probiótica, diversos critérios precisam ser considerados, destacando-se a sobrevivência às condições de

pH, presença de sais biliares, etc do TGI e a capacidade de produzir algum benefício provenientes da competição com os patógenos presentes no cólon. Dentre as espécies de microrganismos destacam-se as bactérias ácido lácticas, que geralmente apresentam um bom desempenho, tornando-se necessário o desenvolvimento de estudos de caracterização das diferentes cepas, tendo em vista as suas particularidades.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar 40 isolados de *Lactobacillus* originados de fezes humana pertencentes à Coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biasi – Volta Redonda – RJ, quanto às suas propriedades probióticas. Assim, avaliou-se a produção de ácido láctico, resistência a sais biliares, resistência ao Cloreto de Sódio, a temperatura e pH. Cepas de *Lactobacillus* previamente selecionadas foram também avaliadas quanto ao efeito antagônico sobre os patógenos: *Salmonella* *tiphy*, *Escherichia coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Estudos relativos a manutenção da viabilidade celular destas cepas em leite reconstituído estocado a 4°C, por um período de 30 dias, foram também conduzidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Probióticos: Histórico e Conceitos

O emprego de leite fermentado no tratamento de distúrbios intestinais já era recomendado por Plinius em 76 a. C. durante o Império Romano e, muito antes disso, conforme relatado na versão pérsica do Antigo Testamento (Genesis 18:8), Abraão atribuía sua longevidade ao consumo de leite coagulado (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

Segundo Oyetayo e Oyetayo (2005), Tannock (2004) e Ötles; Çagindi e Akçiçek (2003) o conceito de probiótico foi introduzido por Elie Metchnikoff em 1908, observando a vida longa de camponeses búlgaros que consumiam alimentos derivados de leite fermentado, sugeriu que os lactobacilos presentes apresentavam alguma ação contrária aos efeitos putrefativos e tóxicos do metabolismo do trato gastrointestinal (TGI).

O termo probiótico recebeu diferentes acepções ao longo do tempo, desde substâncias secretadas por protozoários e suplementos alimentares para animais até chegarmos ao conceito mais aceito hoje, de que probióticos são produtos ou culturas de microrganismos viáveis que podem se implantar ou colonizar em um tecido do hospedeiro, trazendo efeitos benéficos à sua saúde (OYETAYO; OYETAYO, 2005; COPPOLA; TURNES, 2004; TANNOCK, 2004).

Schrezenmeir e Vrese (2001) propõem uma definição mais completa sendo que probióticos são preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos em sua saúde.

Smits *et al.* (2005) sugerem que helmintos (*Schistosoma mansoni*), protozoários (*Toxoplasma gondii*), bactérias orofecais (*Helicobacter pylori*) e vírus (vírus da hepatite A) tenham um efeito protetor contra certas doenças alérgicas, devido ao tipo de estimulação imunológica que fazem. Porém Reid (1999) sugere critérios para a melhor seleção de microrganismos probióticos em que é essencial ser seguramente não patogênico.

Estes microrganismos são utilizados como reguladores da microbiota intestinal, agindo como agentes profiláticos em distúrbios intestinais em geral (DUC *et al.*, 2004) e terapêuticos na recuperação das comunidades microbianas endógenas da mucosa gastrointestinal e vaginal (NAVA; DAVILA, 2004).

Diferente de probiótico, o termo prebiótico é utilizado para designar os ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade de bactérias benéficas no cólon, e o termo simbiótico se refere aos produtos que contêm probióticos e prebióticos associados (COPPOLA; TURNES, 2004; SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

2.2. Probióticos vs Microbiota Intestinal

Pasteur acreditava que os microrganismos eram necessários para uma vida normal, mesmo sem ter recursos para estudar a microbiota humana, muitos pesquisadores acreditavam que as interações entre os microrganismos e seus hospedeiros eram essenciais à vida, tanto no auxílio às condições fisiológicas de digestão, como nas patologias e nos tratamentos de doenças intestinais (FALK *et al.*, 1998).

Embora seja um processo extremamente difícil, há muitos anos, pesquisadores têm tentado elaborar uma avaliação completa da microbiota

intestinal, através do isolamento, identificação e caracterização destes microrganismos (NOVAK *et al.*, 2001).

O trato gastrointestinal humano é rico em nutrientes, desta forma, sendo colonizado por uma vasta e complexa microbiota. (PRIDMORE *et al.*, 2004). O papel preliminar do trato gastrointestinal é digerir e absorver nutrientes para suprir as exigências metabólicas necessárias para o crescimento e o desenvolvimento humano normal. Além disso, a mucosa intestinal fornece uma defesa protetora do indivíduo contra a presença constante dos antígenos do alimento e dos microrganismos no lúmen intestinal. A proteção contra os agentes potencialmente prejudiciais é assegurada por muitos fatores, incluindo a saliva, o ácido gástrico, pelo peristaltismo, pelo muco, pela proteólise intestinal, pela microbiota intestinal, e pelas membranas epiteliais (ISOLAURI *et al.*, 2001).

Após o nascimento, o recém-nascido entra em contato com microrganismos ambientais, sendo estes os primeiros a colonizar o intestino, juntamente com os primeiros alimentos. Quando alimentado com leite materno, a microbiota compõe-se predominantemente de bifidobactérias e lactobacilos, por outro lado, quando alimentado com formulas lácteas observa-se um número maior de coliformes e bacterióides (NOVAK *et al.*, 2001).

Isolauri *et al.* (2001) ressaltam a importância da microbiota maternal e da interferência da dieta na composição da microbiota dos recém nascidos, que se altera ao longo dos anos, passando a ser mais complexa no indivíduo adulto, quando possui mais de 500 espécies só no intestino grosso.

É extremamente difícil para um microrganismo autóctone (de outro lugar) se estabelecer em um nicho ecológico suficientemente regulado por uma população

microbiana estabelecida, devido à exclusão competitiva, o que mantém a estabilidade da microbiota intestinal (TANNOCK, 2004).

A alteração da microbiota intestinal vem sendo reconhecida nos últimos trinta anos como fonte de doenças alérgicas e autoimunes bem como de infecções agudas e crônicas (BENGMARCK; ORTIZ DE URBINA, 2005).

A antibioticoterapia modifica a estabilidade da microbiota natural, selecionando artificialmente e favorecendo a dominância de microrganismos capazes de desenvolver infecções secundárias, que em condições normais não encontrariam condições de desenvolvimento por causa da competição entre as espécies. Para prevenir e tratar as modificações do ecossistema microbiano, sugere-se o uso de probióticos como controladores do desenvolvimento dos microrganismos da microbiota (GUTIÉRREZ *et al.*, 2004).

Em geral os animais são considerados saudáveis, por apresentarem bom funcionamento do sistema intestinal, o que garante a existência de um equilíbrio em sua microbiota intestinal, ao passo que um desequilíbrio nessa microbiota permite a proliferação de organismos patogênicos (MEYER *et al.*, 2001).

Hughes *et al.*, (1999) defendem a hipótese de que as cepas consideradas probióticas, se aderem à mucosa intestinal de forma mais eficaz que outros microrganismos, principalmente as cepas patogênicas, desta forma teriam vantagens competitivas por espaço. Ao mesmo tempo poderiam produzir efeitos antagonistas às cepas patogênicas.

De uma maneira geral, são considerados potencialmente probióticos as bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (GROSSO; TRINDADE, 2004), *Lactococcus* (DESMOND *et al.*, 2004), *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (PRIDMORE *et al.*, 2004), entre outras. Existem

também referências quanto ao uso de microrganismos do gênero *Bacillus* (DUC *et al.*, 2004) e *Saccharomyces* (NAVA; DAVILA, 2004); os quais são selecionados de acordo com as propriedades benéficas ao seu hospedeiro.

Somente em 2003, no periódico *Applied and Environmental Microbiology* foram observadas vinte e duas publicações contendo o termo lactobacilli ou lactobacilo apenas no título do artigo ou no resumo, demonstrando o grande interesse científico nestes microrganismos (TANNOCK, 2004).

Embora o uso de *Lactobacillus* na prevenção e tratamento de doenças não seja recente, atualmente, o interesse pelo uso dos probióticos têm sido renovado. Apesar do grande interesse nos alimentos funcionais, é difícil estabelecer cepas com evidência científica que suporte o seu uso em humanos (REID, 1999).

2.3. Mecanismos de Ação

Probióticos são recomendados em dietas para fortalecer o sistema imunológico intestinal, atenuar alergias alimentares, diminuir o colesterol, melhorar a absorção de nutrientes, atenuar a intolerância à lactose e também para prevenção de câncer (DONALDSON, 2004; COPPOLA; TURNES., 2004; KANAMINOAWA; NANNO 2004). Embora existam diversos estudos sobre o efeito imuno-modulador dos microrganismos considerados probióticos, as formas de ação ainda estão pouco esclarecidas, sugerindo a necessidade de aprofundamentos científicos nesta área (COPPOLA; TURNES, 2004; KANAMINOAWA; NANNO 2004).

Existem vários produtos probióticos no mercado, com características distintas. Embora o uso de probióticos pareça promissor, é preciso cautela para poder escolher o melhor probiótico para uma determinada situação (NAVA; DAVILA, 2004).

Vários microrganismos, tipicamente bactérias ácido lácticas dos gêneros lactobacilos, bifidobacteria e enterococos, bem como algumas leveduras tem se revelado com grande potencial probiótico, pois além de apresentarem grande resistência as condições ácidas do ambiente gastrointestinal, possuem elevada taxa de aderência à mucosa intestinal, bem como atividade antagonista a outros microrganismos (WEESE *et al.*, 2003).

Diversos modos de ação dos probióticos têm sido considerados, sendo a interferência bacteriana com patógenos intestinais uma modalidade de ação bem estabelecida e pode ser mediada pelas bacteriocinas, substâncias antimicrobianas específicas que antagonizam patógenos intestinais. Entretanto, os probióticos parecem também afetar diretamente a função imune da mucosa com a modulação da síntese da imunoglobulina A (IgA), a formação do muco, ou as alterações do contrapeso antiinflamatório mediado pelas citocinas locais (WEHKAMP *et al.*, 2004).

Os efeitos benéficos dos probióticos podem ser resultantes de um antagonismo direto a certos grupos de microrganismos ou pela estimulação da imunidade. Estes podem competir com os patógenos pelos locais de ocupação, pelos nutrientes disponíveis e outros fatores de crescimento, ou podem simplesmente melhorar a eficiência do sistema imunológico e estimular as células imunomoduladoras (OYETAYO; OYETAYO, 2005).

2.3.1. Adesão à mucosa e estimulação do sistema imunológico

Acredita-se que o maior benefício obtido com uso de probióticos está relacionado com a aderência dos microrganismos ao muco e ao epitélio intestinal. Recentemente, tem-se sugerido que a adesão celular de *Lactobacillus johnsonii* ao

epitélio intestinal, se deve ao ácido lipoteicóico presente na superfície do microrganismo (GRANATO *et al.*, 2004).

A adesão ao epitélio e a mucosa intestinal está associada à estimulação do sistema imune, e também é importante para a colonização. Um pré-requisito para os probióticos é regular a microbiota intestinal. O muco intestinal desempenha um papel duplo; protege a mucosa de determinados microrganismos ao fornecer um local inicial, fonte de nutrientes, e a matriz em que bactérias podem proliferar (JUNTUNEN *et al.*, 2001).

A presença de microrganismos com propriedades probióticas no intestino é de grande importância, visto que estes compõem um ecossistema, impedindo a colonização por espécies patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, através de um efeito competitivo ou produzindo compostos inibitórios (JACOBSEN *et al.*, 1999).

Espécies de *Lactobacillus* ao colonizarem a mucosa intestinal, se aderem a este tecido estabilizando a microbiota local dos animais durante as fases de desenvolvimento e do organismo adulto (PEÑA *et al.*, 2004).

O uso de agentes probióticos parece ser muito significativo contra diarreias virais, sugerindo a existência de um mecanismo imunológico responsável por este benefício. Também pode ser observado com relação a afinidade do microrganismo a mucosa intestinal, uma a ativação do sistema imune inato, estimulando a atividade de células Natural Killer (NOVAK *et al.*, 2001).

As células linfóides situam-se em três compartimentos distintos no trato gastrointestinal: tecido linfóide organizado associado ao trato gastrointestinal (GALT), lâmina própria, e epitélio superficial. O GALT compreende as placas de Peyer, o apêndice, e os numerosos linfonodos, acredita-se que estes locais são

indutivos para respostas imunes intestinais. A lâmina própria e o compartimento epitelial constituem locais efetores, mas não são importantes nos termos da expansão celular e da diferenciação dentro do sistema imune da mucosa. O GALT e outras estruturas linfóides mucosa-associadas do tecido (MALT) são cobertos por um epitélio folículo-associado característico (FAE), que contenha as células da membrana (M) (Figura 1.). Estas células epiteliais finas especializadas são particularmente eficazes na captação de antígenos vivos e inoperantes do lúmen intestinal, especialmente quando naturalmente particulado, muitas bactérias infecciosas enteropatogênicas e os agentes virais usam as células M como portal da entrada (BRANDTZAEG, 2002).

Após reagir com componentes bacterianos, nas placas de Peyer, os linfócitos migram para as paredes do trato gastrointestinal disseminando resposta imune para todo intestino (NOVAK *et al.*, 2001).

A exclusão imune limita a colonização epitelial dos patógenos e inibe a penetração do material exógeno prejudicial. Esta primeira linha de defesa é mediada principalmente por anticorpos secretórios da classe de IgA (e IgM) na cooperação com os vários fatores protetores inatos inespecíficos . A imunidade secretória é estimulada preferencialmente pelos patógenos e por outros antígenos particulados feitos exame acima através das células M situadas no epitélio superior que cobre o tecido linfóide mucosa-associado indutivo (Figura 1). Os antígenos ambientais e dietéticos solúveis inócuos penetrantes assim como a microbiota normal é moderadamente estimulatória para a imunidade secretória, mas induzem a supressão de resposta imune humoral pró-inflamatória (anticorpos citocina-dependentes de IgG e de Th2 IgE) bem como a hipersensibilidade citocina-dependente do Th1 (DTH). O contrapeso Th2/Th1 homeostático é regulado por uma

tolerância mucosa ou "oral" do complexo e do fenômeno mal definido, que exerce efeitos supressores localmente e na periferia (BRANDTZAEG, 2002).

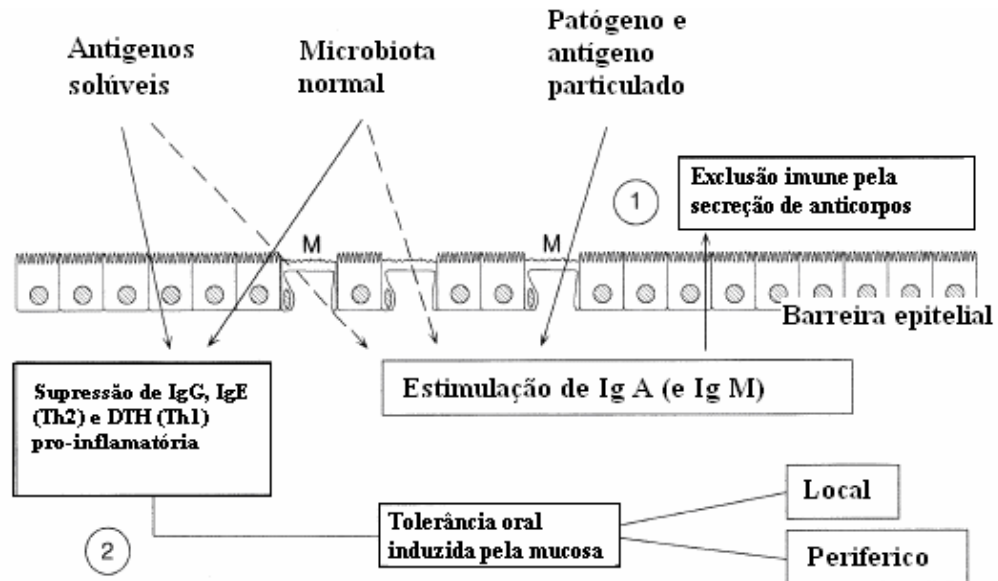


Figura 2.1. Esquema de dois mecanismos imunes adaptativos que operam na superfície da mucosa. Fonte: BRANDTZAEG, 2002.

O sistema imune da mucosa gastrointestinal é estimulado diariamente pela passagem contínua de alimento e de antígenos microbianos. O efeito destas proteínas na mucosa intestinal se deve a ativação e supressão das células T, conduzindo a uma resposta aos antígenos protéicos ingeridos, representando uma tolerância oral. A supressão ativa é definida como um estado da resposta do Linfócito T induzido pela ação direta das células T regulatórias, que secretam fatores de inibição tais como o fator β e o fator do crescimento e a interleucina-10 (IL-10). Muitos fatores parecem afetar a indução da tolerância, incluindo a idade do hospedeiro, natureza e a dosagem do antígeno, e da frequência da alimentação. A microbiota intestinal se apresenta com o papel principal na indução e na manutenção da tolerância, mas seu mecanismo ainda não foi bem elucidado (PRIOULT; PECQUET; FLISS, 2004).

Em trabalho desenvolvido por Perdigon *et al.* (1986) após dois dias de administração de produtos probióticos com células viáveis e não viáveis, foi observado *in vitro* atividade fagocitária, dos macrófagos peritoneais de ratos, superior aos índices do grupo controle.

Muitos trabalhos científicos têm se preocupado com uma possível reação de hipersensibilidade com agentes probióticos, mas não existem indicativos de possibilidade de bactérias ácido lácticas causarem este tipo de reação, embora comprovadamente se observe um aumento da resposta fagocitária de modo geral, sendo que a maneira como isto ocorre ainda não foi determinada (ERICKSON; HUBBARD 2000).

Outro parâmetro estudado consiste na maturação de células dendríticas e sua estimulação através de moléculas coestimuladoras da família B7 por probióticos *in vitro*, observando-se um modesto aumento de sua expressão (DRAKES; BLANCHARD; CZIN, 2004).

Segundo Isolauri (2001), probióticos foram testados para aumentar as diferentes barreiras do trato gastrointestinal, por exclusão imune, eliminação imune, e regulação imune. Foram testados também para estimular a resistência inespecífica do hospedeiro aos patógenos microbianos, ajudando desse modo na eliminação dos mesmos. Conseqüentemente, a aplicação clínica melhor documentada dos probióticos consiste no tratamento de diarreia aguda. Nos seres humanos, os efeitos documentados foram relatados para o alívio da inflamação intestinal, da normalização de disfunções das mucosas intestinais, e do controle de reações de hipersensibilidade. Estes resultados mostram que os probióticos promovem mecanismos endógenos de defesa do hospedeiro. Assim, a modificação da microflora intestinal pela terapia probiótica pode oferecer um potencial terapêutico

nas circunstâncias clínicas associadas com a disfunção da barreira intestinal e a resposta inflamatória.

A resposta imune pode ajudar a controlar a população de bactérias intestinais, limitar sua translocação e diminuir os riscos de infecção. Com o tempo, a microbiota intestinal pode induzir à tolerância imunológica, tendo como resultado a diminuição da capacidade de reação a alguns de seus componentes. Estes microrganismos aumentam constantemente as linhas de defesa do trato gastrointestinal, que permite o estabelecimento desta convivência dinâmica entre os seres humanos e os microrganismos (NOVAK *et al.*, 2001).

Segundo Ma, Forsythe e Bienenstock (2004) o mecanismo da ação antiinflamatória aparente de organismos probióticos é obscuro. O *Lactobacillus reuteri* é eficaz na inibição de colites de ratos deficientes de interleucina-10 (IL-10). Baseados em experimentos projetados para explorar o mecanismo do efeito do *Lactobacillus reuteri* nas linhas epiteliais humanas T84 e HT29, na síntese de fator de crescimento neural (NGF) e a resposta em IL-8 ao fator de necrose do tumoral alfa (Tnf- α). Concluíram que *Lactobacillus reuteri* tem a atividade antiinflamatória ao epitélio humano, sendo provavelmente relacionada à atividade do probiótico ingerido.

As bactérias ácido lácticas compreendem uma porcentagem significativa da microbiota normal do trato gastrointestinal. Estes microrganismos exercem vários efeitos benéficos no hospedeiro, modulam a função imune do indivíduo e os antígenos do lúmen ganham o acesso ao tecido linfóide da mucosa através das placas de Peyer no intestino delgado. A atividade das vacinas diretamente a este local poderia realçar a probabilidade do hospedeiro encontrar o antígeno imunizante. Embora as vacinas atualmente usadas sejam eficazes, empregam bactérias

patogênicas atenuadas tais como *Micobacterium*, *Salmonellae*, e *Clostridium*, muitos dos quais foram estudados associados com as placas de Peyer. As bactérias do ácido láctico são microrganismos considerados seguros e estão sendo avaliados para o uso como um sistema da entrega do antígeno em vetor vivo. As bactérias ácido lácticas se associam ao trato gastrointestinal de várias maneiras (PLANT; CONWAY 2001).

Bactérias ácido lácticas recombinantes provaram ser imunogênicas pela rota intranasal nos ratos e excitar respostas sistêmicas muito elevadas de imunoglobulina G (IgG1, IgG2b, e IgGa) correlacionada a dose do antígeno (GRANGETTE *et al*, 2001).

2.3.2. Competição e produção de compostos antimicrobianos

Bactérias produtoras de ácido láctico vem sendo usadas como probióticos, quando estes microrganismos vivos são ingeridos a fim de se obter algum efeito benéfico. Muitas bactérias ácido lácticas têm sido empregadas com finalidades bioterapêuticas contra a intolerância à lactose, para a recomposição da microbiota após antibioticoterapia, na profilaxia e tratamento contra diarreias infantis, redução das infecções urinárias recorrentes e candidíase vaginal (WAGNER *et al.*, 1997).

Muitas cepas de microrganismos probióticos são produtoras de substâncias antimicrobianas *in vitro* como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e bacteriocinas (RASTALL *et al.*, 2005). Destre estes destaca-se *Lactobacillus reuteri*, habitante natural da microbiota intestinal humana e animal, que pode produzir um agente antimicrobiano de amplo espectro, a reuterina, que facilita a sobrevivência do *L. reuteri* no ecossistema intestinal (WOLF *et al.*, 1998).

A competição pelos nutrientes, a inibição deste ou aquele grupo de microrganismos por metabólitos, a predação e o parasitismo são os fatores responsáveis pela regulação da microbiota intestinal (TANNOCK, 2004). Oyetayo (2004) observou o efeito antagonista de seis cepas de *Lactobacillus* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus* e concluiu que a inibição ocorreu devido à presença dos ácidos orgânicos produzidos pelos *Lactobacillus*, uma vez que o tratamento com tripsina não alterou a inibição, mas a mudança do pH.

Asahara *et al.* (2004) observou a atividade anti-infecciosa de bifidobacteria com propriedade probiótica contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) O157:H7, que foi examinada em um modelo fatal da infecção de ratos. A patogenicidade da infecção de STEC, caracterizada por perda acentuada do peso do corpo e pela morte subsequente, observadas nos controles infectados foi inibida, pois produziram uma concentração elevada do ácido acético e abaixaram o pH do intestino, estes efeitos foram estudados para ser relacionados à atividade anti-infecciosa porque a combinação de uma concentração elevada do ácido acético e de um pH baixo foi encontrada para inibir a produção de toxina Shiga durante o crescimento de STEC *in vitro*.

A maioria dos alimentos probióticos contém bactérias ácido lácticas, porque são participantes naturais da microbiota de quase todos os organismos, raramente são patogênicas e apresentam propriedades antagônicas contra os microrganismos patogênicos (BRIZUELA; SERRANO; PÉREZ, 2001).

Pesquisando *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio na microbiota vaginal de mulheres grávidas, Wilks *et al.* (2004) concluíram que estes microrganismos são capazes de reduzir a incidência de infecções uterinas.

Algumas espécies de *Lactobacillus* produzem uma enzima hidrolase de sais biliares, que ao reduzir a disponibilidade de sais biliares na luz intestinal, estimula uma nova síntese de ácidos biliares à partir do colesterol sérico, reduzindo assim as taxas de colesterol (PRAKASH; JONES, 2005).

2.4. Aplicações industriais

Atualmente, microrganismos probióticos vêm sendo empregados na medicina humana para a prevenção e o tratamento das disfunções da microbiota intestinal, distúrbios de metabolismo, para imunomodulação e como anticarcinogênicos. Em medicina veterinária são usados como promotores do crescimento em substituição aos antibióticos convencionais (COPPOLA; TURNES, 2004).

As bactérias lácticas inibem o crescimento de vários microrganismos indesejáveis e patogênicos nos alimentos. Além de lhes conferir características sensoriais desejáveis, estendem a sua vida útil e melhoram a sua qualidade sanitária. Isto se deve aos metabólitos produzidos por estes microrganismos, principalmente os ácidos orgânicos e as bacteriocinas (PRADO *et al.*, 2000).

Lactobacillus sakei é tido como produtor de bacteriocinas e ácidos orgânicos, sendo estudado seus efeitos na fermentação e conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*), demonstrando os efeitos benéficos na conservação natural dos alimentos sem a adição de conservantes químicos (ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2003).

Haddadin, Awaishah e Robinson (2004) observaram as características de iogurte preparado com probióticos selecionados de fezes de crianças, quanto ao número de células viáveis durante quinze dias de armazenamento, sendo em todos

os casos satisfatória segundo as recomendações mínimas terapêuticas. Observaram também que poderiam haver cepas com propriedades distintas, sendo necessário se desenvolver um produto específico para cada efeito desejado.

Bactérias ácido lácticas isoladas de salame tipo italiano, principalmente *Lactobacillus bifementans*, foram descritas por Maciel *et al.* (2003) como portadoras de atividade antagonista frente aos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

Martinis *et al.* (2001) conseguiram isolar bactérias ácido lácticas de produtos cárneos brasileiros produtoras de bacteriocinas com efeito sobre *Listeria monocytogenes*, sendo que todas as bacteriocinas se foram sensíveis à ação de proteases.

A cinética de fermentação, crescimento e acidificação vem sendo estudada em leites fermentados, incluindo sobre a viabilidade celular e o efeito de pós acidificação para várias cepas consideradas probióticas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* em associação com *Streptococcus thermophilus* buscando-se aperfeiçoar a acidificação e pós acidificação adequada, bem como a firmeza do produto e a viabilidade celular de microrganismos probióticos recomendadas para fins terapêuticos (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

2.5. Critérios para seleção de microrganismos probióticos

Na seleção de cepas microbianas para uso probiótico, muitos critérios precisam ser considerados, incluindo aspectos relacionados com a segurança alimentar, produção e processamento, método de administração, mecanismo de

ação, sobreviver e colonizar o hospedeiro e ter tolerância à bile (REQUE *et al.*, 2000).

Para Coppola e Turnes (2004) além das propriedades benéficas desejadas, os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e o transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, não transportar genes transmissores de resistência aos antimicrobianos e possuir propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas, bem como resistir à ação dos fagos e tolerar o oxigênio.

Haddadin, Awisheh e Robinson (2004) destaca dentre as qualidades desejáveis de um possível probiótico que estão além da resistência ao pH e a bile, o efeito antagonista aos patógenos intestinais, a assimilação de colesterol e a adesão às células da mucosa intestinal.

Ötles, Çagindi e Akçiçek (2003) sugeriu vários requisitos para que um microrganismo seja identificado como um efetivo probiótico: 1) Adesão celular; 2) Excluir ou reduzir a adesão de patógenos; 3) Persistir e multiplicar-se; 4) Produção de ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas com efeito antagonista aos microrganismos patogênicos; 5) Ser seguramente não invasivo, não patogênico e não carcinogênico; 6) Participar da microbiota normal balanceada .

Para que um microrganismo possa cumprir com o papel de protetor do trato gastrointestinal, deve possuir características tais como: ser habitante normal do intestino, ter um tempo de reprodução curto, ser capaz de produzir compostos antimicrobianos e ser estável durante o processo de produção, comercialização e distribuição, para que possa se encontrar vivo no trato gastrintestinal (BRIZUELA HERRADA, 2003).

2.5.1. Produção de ácido Lático

A maior atividade das bactérias do ácido lático é de converter carboidratos em ácido lático, no entanto o acúmulo deste ácido no meio em altas concentrações pode inibir o crescimento destes microrganismos (MAGNI *et al.*, 1998). Apesar disto, os *Lactobacillus* são geralmente mais resistentes ao ácido lático do que muitos outros microrganismos, que são fortemente inibidos pela concentração deste ácido orgânico (GIRAUD; LELONG; RAIMBAULT, 1991). O efeito de inibição do ácido lático e outros ácidos orgânicos é principalmente atribuído à forma não dissociada da molécula. Esta forma molecular atravessam a membrana celular por difusão facilitada em direção ao meio mais alcalino (citossol) (HUTKINS; NANNEN, 1993). Este composto inibe o metabolismo por interferência com o transporte de fosfato da membrana celular (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). No citoplasma, onde o pH é alto, o ácido lático dissocia-se em correspondência com a equação de Henderson-Hasselbach, resultando na diminuição no pH intracelular (MCDONALD; FLEMMING; HASSAN, 1990).

A importância da homeostase do pH e o efeito do pH intracelular na atividade metabólica nos microrganismos têm adquirido grande reconhecimento. O pH intracelular afeta a captação de nutrientes, como K^+ , fosfato e aminoácidos. Sendo também apontado como importante componente da força motriz de próton, refletindo em um profundo efeito sobre a bioenergética da célula. O pH intracelular está envolvido ou é integrante em outros processos metabólicos e atividades (HUTKINS; NANNEN, 1993).

Em um experimento para determinar o efeito do pH e a concentração de lactato sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum*, Pieterse (2006) demonstrou

que os efeitos eram menores quando o pré-crescimento era realizado na presença de lactato de sódio, indicando respostas adaptativas diferentes para uma mesma situação de baixo pH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e Manutenção

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté - UNITAU. As quarenta cepas de *Lactobacillus* isoladas de fezes humanas, bem como as cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes* foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biasi – Volta Redonda – RJ. Foi utilizada também uma cepa de *Salmonella tiphy* cedida pelo Instituto Adolfo Lutz de Taubaté. Como referência para efeito de comparação quanto às propriedades avaliadas empregou-se a cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, cedida pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

As cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo MRS (Difco) contendo em g/L peptona 10,0, extrato de carne 10,0, extrato de levedura 5,0, glicose 20,0, Tuwee80 1,0, citrato de amônia 2,0, acetato de Sódio 5,0, sulfato de Magnésio 0,1, sulfato de Manganês 0,05 e fosfato de diPotássio 2,0 e em ágar MRS (Oxoid) contendo em g/L peptona 10,0; “Lab-Lemco” powder 8,0; extrato de levedura 4,0, glicose 20,0; mono-oleato sorbato 1,0; citrato de amônia 2,0; acetato de Sódio 5,0, sulfato de Magnésio 0,2; sulfato de Manganês 0,05 e fosfato de diPotássio 2,0 e conservados 4°C.

A cepas de *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella tiphy* foram cultivadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e caldo BHI (Difco) contendo em g/L 200,0 de Infusão de cérebro bovino 7,7; 250,0 de infusão de coração bovino 9,8; peptona 2,0; glicose 2,0; cloreto de Sódio 5,0; fosfato de diSódio 2,5 g/L, e adição de 15,0 g de ágar para meio semi-sólido) e conservados de 15 a

25°C no meio de Gelose constituído de peptona 1,0 ; extrato de carne 0,5; cloreto de Sódio 0,85g/L.

3.2. Resistência ao cloreto de sódio, sais biliares, temperatura, pH e produção de ácido láctico

3.2.1. Resistência ao cloreto de sódio pelas cepas de *Lactobacillus*

Microplacas esterilizadas por radiação gama com cobalto 60 (Embrarad), com 96 orifícios contendo caldo MRS (Difco) suplementado com concentrações crescentes de NaCl (0,23; 0,47; 0,94; 1,9; 3,7; 7,5 e 15%) (Figura 3.2) foram inoculadas com 1% de uma suspensão das respectivas células de *Lactobacillus* contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL, obtido com a diluição de 1/10 da turbidez 0,5 da escala de MacFarland (ANVISA, 2003), atingindo volume total de 200 µL. As placas foram então incubadas por 24 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e a estimativa de crescimento foi realizada por meio de leitura da absorbância à 600 nm em leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices) (Figura 3.3). Este teste foi realizado em duplicata.

3.2.2. Resistência a sais biliares pelas cepas de *Lactobacillus*

Microplacas esterilizadas por radiação gama com cobalto 60 (Embrarad), com 96 orifícios contendo caldo MRS (Difco) suplementado com concentrações de sais biliares (Oxoid): 0,16%; 0,31%; 0,62%; 1,25%; 2,5%; 5,0% e 10% (Figura 3.2), foram inoculadas com 1% de uma suspensão de células das respectivas cepas de *Lactobacillus* contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL obtido com a diluição de 1/10

da turbidez 0,5 da escala de MacFarland (ANVISA, 2003), atingindo um volume total de 200 μL . As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e a estimativa de crescimento foi realizada por meio de leitura da absorbância à 600 nm em leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices) (Figura 3.3). Estes experimentos foram executados em duplicata.



Figura 3.2. Microplacas esterilizadas com cobalto 60, preenchidas com caldo MRS

3.2.3. Crescimento das cepas de *Lactobacillus* em diferentes temperaturas

Microplacas esterilizadas por radiação gama com cobalto 60 (Embrarad), com 96 orifícios contendo caldo MRS (Difco) (Figura 3.2) foram inoculadas com 1% de uma suspensão de células das respectivas cepas *Lactobacillus* contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL obtido pela diluição de 1/10 da turbidez 0,5 da escala de MacFarland (ANVISA, 2003), atingindo um volume final de 200 μL . Em seguida foram incubadas a 15, 37 e 45°C por 24 horas em atmosfera com 5% de CO_2 sendo o monitoramento do crescimento realizado por meio de leitura da absorbância à 600 nm em leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices) (Figura 3.3). Estes experimentos foram realizados em quadruplicata

3.2.4. Crescimento das cepas de *Lactobacillus* em diferentes condições de pH

Microplacas esterilizadas por radiação gama com cobalto 60 (Embrarad), com 96 orifícios contendo caldo MRS (Difco) com pH ajustado com HCl em 3.0, 5.0, 6.0 e 7.0 (Figura 3.2), foram inoculadas com 1% de uma suspensão de células das respectivas cepas de *Lactobacillus* contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL obtido por meio de diluição de 1/10 da turbidez 0,5 da escala de MacFarland (ANVISA, 2003). Em seguida foram devidamente incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂, sendo o crescimento determinado por meio de leitura da absorbância à 600 nm em leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices) (Figura 3.3). Estes experimentos foram realizados em quadruplicata.



Figura 3.3. Leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices)

3.2.5. Produção de ácido láctico pelas cepas de *Lactobacillus*

As cepas de *Lactobacillus* mantidas em Agar MRS 4°C foram reativadas em tubos contendo ágar MRS em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C por 24 h. Em seguida foi realizado um repique para frascos Erlenmeyer de 100mL contendo 50 mL de caldo MRS (Difco) a 37°C por 24 horas em condições de atmosfera de 5% de CO₂ e amostras nos tempos 0, 12 e 24 horas foram coletadas, centrifugados por 10 minutos à 1800 xg, para remoção das células, sendo os sobrenadantes recolhidos e apropriadamente diluídos com água deionizada. Numa etapa posterior as amostras já diluídas foram filtradas em C18 SEP-PACK CARTRIDGE (Waters Associates – MILIPORE) e a dosagem de ácido láctico foi determinada por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento WATERS (Figura 3.4), nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado; fluxo: 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração. A concentração do ácido láctico foi calculada a partir de curva de calibração obtida de soluções padrão.



Figura 3.4. Equipamento de cromatografia líquida Waters

3.2.6. Correlação entre UFC/mL e absorvância a 600 nm

Para auxiliar a análise dos resultados dos experimentos anteriores estabeleceu-se uma correlação entre UFC/mL e a leitura de absorvância a 600 nm. Para tanto, realizou-se a leitura de DO_{600} em microplaca (Figura 3.2), de várias diluições de suspensão de células referente ao crescimento por 24 horas das respectivas cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS (Difco), mantidas nas mesmas condições dos ensaios anteriores. Paralelamente procedeu-se a contagem de células (UFC/mL) das respectivas suspensões celulares devidamente diluídas em solução fisiológica 0,9%, por meio de plaqueamento em profundidade pelo método de pour plate usando volume de inóculo de 1 ml em ágar MRS (Oxoid), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 48 horas, após o que foram contadas as colônias nas placas que continham de 30 a 300 colônias (Figura 3.5).



Figura 3.5. Colônias de *Lactobacillus* em ágar MRS semeadas por pour plate.

3.3. Efeito antagônico das cepas de *Lactobacillus* sobre as cepas patogênicas

As cepas selecionadas em conformidade com os critérios empregados na etapa anterior, foram reativadas em caldo MRS (Difco) por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida as cepas foram semeadas em profundidade com auxílio de um fio de platina, em placas contendo ágar MRS (Oxoid) e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Uma vez observado o crescimento em profundidade, sobre a superfície do ágar MRS foram adicionados 10 mL de ágar BHI semi-sólido (com 1% ágar bacteriológico) contendo 1 % de cultura ativada por 24 h em caldo BHI das respectivas cepas patogênicas. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min para garantir a completa solidificação do meio e novamente incubadas a 37° C por 24 h. O efeito antagônico foi observado pela formação de um halo de inibição ao redor das colônias de *Lactobacillus*, cujo diâmetro foi expresso mm (Figura 3.6).



Figura 3.6. Deteminação do efeito antagônico por formação de halos de inibição

3.4 Determinação da viabilidade celular das cepas de *Lactobacillus* em condições de estocagem

Para avaliar a capacidade das cepas selecionadas em manter a viabilidade celular, bem como avaliar a produção de ácido láctico em leite, 0,5 mL de uma cultura celular em caldo MRS das respectivas cepas foram inoculadas em frascos contendo 350 mL de leite em pó Mólico (NESTLÉ) reconstituído a 10% em água, esterilizado a 0,5 atm por 15 minutos. Os frascos foram incubados à 37° C por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂. Após o que, estes frascos foram acondicionados a 4° C por 29 dias com amostragens periódicas em intervalos de 48 a 72 horas para avaliação do grau de acidez titulável (Figura 3.7) e da população de *Lactobacillus*, que foi expressa em UFC/mL (Figura 3.5).



Figura 3.7. Determinação de acidez titulável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da resistência ao Cloreto de Sódio

Bactérias envolvidas em processos tecnológicos de alimentos são expostas a severas condições de estresse, como a presença de NaCl (MARCEAU *et al.*, 2004), desta forma, conhecer e selecionar cepas resistentes a tais condições é importante para garantir sua manutenção em produtos manufaturados (KASK *et al.*, 2003).

Tendo em vista selecionar cepas resistentes ao cloreto de sódio, no presente trabalho, experimentos foram conduzidos visando avaliar o crescimento das respectivas cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS, contendo: 0,23%; 0,47%; 0,94%; 1,9%; 3,7%, 7,5% e 15,0 % de NaCl, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.1.

Considerando o valor de DO superior a 0,412, cuja concentração celular é superior a $1,05 \times 10^8$ UFC/mL, como indicativo de crescimento satisfatório, observa-se que as cepas Lac 05, 17, 18, 20 e 21 apresentaram elevada sensibilidade às concentrações de NaCl avaliadas. Neste contexto, vale ressaltar que as cepas Lac 01, 03 e 14 apresentaram crescimento satisfatório em caldo MRS contendo concentrações menores que 3,7% de NaCl. No tocante a avaliação do crescimento das respectivas cepas em caldo MRS contendo concentrações equivalentes a 7,5 e 15,0 % de NaCl considerou-se como satisfatório os cultivos que apresentaram valores de DO superiores a 0,100, correspondendo a uma concentração celular superior a $2,43 \times 10^7$ UFC/mL. Desta forma, observa-se que 31% das cepas avaliadas apresentaram resistência à concentração de 7,5% de NaCl e 100% das mesmas não apresentaram crescimento algum no caldo MRS contendo 15,0% deste sal.

Barreto *et al.* (2003) sugerem a seleção de cepas de microrganismos probióticos mais resistentes às condições de stress, atingindo concentrações superiores a 10^7 UFC/mL, o que justifica os valores de DO considerados no presente trabalho como indicativo de crescimento satisfatório das cepas avaliadas.

Marceau *et al.* (2004) verificaram em seus estudos com *Lactobacillus sakei*, que as células quando colocadas frente a situações de estresse, como baixas temperaturas e presença de NaCl, produziram proteínas ou sequências polipeptídicas que em situações normais não são traduzidas. Uma parte destas proteínas está diretamente relacionada aos mecanismos de resistência ao estresse.

As cepas de lactobacilos resistentes a largas variações de cloreto de sódio são de grande importância para a indústria de alimentos, sendo recomendável o uso de cepas que mantenham a viabilidade celular acima de 10^8 UFC/mL, mesmo na presença de 4% de NaCl (HAULY; NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2001).

Espírito Santo *et al.* (2003) encontraram as melhores condições para fermentação de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) por *Lactobacillus sakei* 2ª em meio contendo 6% de NaCl, resultado atribuído principalmente à inibição dos microrganismos contaminantes, atingindo 9,8 Log₁₀ UFC/g em 7 dias.

Kask *et al.* (2003) detectaram diminuição na taxa de crescimento de *Lactobacillus paracasei* e *L. curvatus* em até 59% do crescimento máximo em meio contendo concentração de 6,5% de NaCl. Observaram ainda que, a presença deste sal causava alterações na morfologia celular.

4.2. Avaliação da resistência a sais biliares

Para que uma cepa microbiana seja selecionada como probiótico, existe a necessidade, da mesma se manter viável às diversas condições expostas no sistema gastrointestinal (RÖNKA *et al.*, 2003; CATANZARO; GREE, 1997). Embora algumas cepas de lactobacilos apresentem resistência a tais condições, destacando-se pH baixo e presença de sais biliares, estas características não podem ser generalizadas, podendo ocorrer variabilidade de resistência entre gêneros ou espécies (MARTINS *et al.*, 2006).

Desta forma, no presente trabalho, a fim de avaliar a capacidade das cepas estudadas quanto à resistência a sais biliares, experimentos foram realizados onde as respectivas cepas foram propagadas em caldo MRS contendo: 0,16%; 0,31%; 0,62%; 1,25%; 2,5%; 5,0% e 10,0% de sais biliares, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.2. Considerou-se como crescimento satisfatório, as culturas que apresentaram valores de D.O. superiores a 0,412 correspondente a $1,05 \times 10^8$ UFC/mL, conforme proposto por Haully, Nogueira e Oliveira (2001).

Desta forma, verifica-se que 85% das cepas avaliadas apresentaram crescimento satisfatório em caldo MRS contendo sais biliares nas concentrações estudadas. Observa-se ainda que as cepas *L. fermentum* Lac 01 e *L. casei* Lac 03 foram sensíveis às concentrações de 0,15, 0,31, 0,62, 1,25 e 10,0 % de sais biliares, apresentando resistência às concentrações 2,5 e 5,0 % destes sais.

Estudos conduzidos por Bron *et al.* (2004), sobre a caracterização genética de *Lactobacillus plantarum* em resposta a presença de sais biliares, revelaram que 0,1% de sal biliar permite a expressão de 31 genes, sendo 8 envolvidos com a formação da membrana celular, 3 relacionados a parede celular, 5 envolvidos com

reações de redução e 5 com fatores de regulação, o que explica o comportamento das cepas Lac 01 e 03.

Nota-se ainda que, as cepas *L. fermentum* Lac 08 foram sensíveis às concentrações de sais biliares superiores a 1,25%. Este mesmo comportamento foi também observado para a cepa Lac 11 para concentrações acima de 0,62% e para as cepas Lac 16 e 39 para as concentrações de 5,0 e 10,0% de sais biliares.

Segundo Clark; Lanz; Sênior (1969) os sais biliares conjugados apresentam a função de promover a formação de emulsões e interferem na digestão e absorção de lipídios na região proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno). Por outro lado, estes sais são tóxicos para células bacterianas, uma vez que os mesmos desagregam a camada fosfolipídica da membrana celular (THANASSI; CHENG; NIKAIDO, 1997), promovendo a lise da célula (BRON *et al.*, 2004).

Desta forma, o grau de resistência aos sais biliares é um critério importante para a seleção de cepas microbianas que apresentam propriedades probióticas (ANDRIGHETTO; GOMES, 2003). Entretanto, existe uma grande dificuldade em simular *in vitro* os parâmetros que afetam a sobrevivência dos respectivos microrganismos *in vivo* (MARTINS *et al.*, 2006). Assim, observa-se na literatura (JACOBSEN *et al.* 1999; ANDRIGHETTO; GOMES 2003; BEGLEY; GAHAN; HILL 2002; AZCARATE-PERIL *et al.* 2004; KLAENHAMMER; KLEEMAN 1981) trabalhos nos quais foram avaliados o crescimento de microrganismos probióticos em meio contendo de 0 a 5,0 % de sais biliares.

Tabela 4.2. Valores de Densidade Óticas das culturas de *Lactobacillus* na presença de diferentes concentrações de sais biliares.

Espécies	Código	Sais Biliares							
		0,0 %	0,16 %	0,31%	0,62 %	1,25 %	2,5 %	5,0 %	10,0 %
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,761	0,053	-0,013	-0,027	-0,024	0,800	0,693	0,077
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,341	1,328	1,342	1,442	1,479	1,477	1,387	1,291
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,312	0,391	0,339	-0,029	-0,016	0,505	0,552	0,074
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,345	1,346	1,376	1,482	1,548	1,487	1,411	1,324
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,668	0,666	0,670	0,647	0,555	0,587	0,630	0,682
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,321	1,366	1,373	1,445	1,502	1,506	1,420	1,257
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,203	1,339	1,317	1,428	1,424	1,432	1,331	1,267
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,033	0,993	0,685	0,470	0,404	0,212	0,037	0,081
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	1,078	0,661	0,755	0,989	0,850	0,718	0,752	0,759
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,076	1,025	0,878	1,050	0,715	0,617	0,522	0,189
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	1,107	0,627	0,405	0,768	0,154	0,056	0,008	0,116
<i>L. plantarum</i>	Lac 12	1,084	0,917	0,825	0,724	0,687	0,757	0,700	0,480
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,125	0,680	0,830	1,085	1,224	0,823	0,748	0,641
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,331	1,259	1,365	1,407	1,388	1,413	1,318	1,132
<i>L. fermentum</i>	Lac 15	1,356	1,344	1,359	1,473	1,498	1,512	1,421	1,328
<i>L. fermentum</i>	Lac 16	1,117	0,900	0,932	0,641	0,757	0,778	0,372	0,574
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,612	0,767	0,839	1,081	1,151	0,602	0,561	0,465
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,593	0,746	0,831	1,113	1,226	0,858	0,756	0,539
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,340	1,346	1,376	1,481	1,518	1,512	1,391	1,353
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,908	0,735	0,781	0,829	0,831	0,738	0,915	0,690
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,981	0,394	0,580	0,569	0,456	0,515	0,554	0,691
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,174	1,153	1,148	1,156	0,959	1,181	1,459	1,138
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,258	1,347	1,314	1,434	1,491	1,509	1,412	1,350
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,227	1,260	1,341	1,426	1,458	1,526	1,437	1,322
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,318	1,315	1,293	1,369	1,485	1,511	1,408	1,278
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,190	1,300	1,323	1,458	1,461	1,448	1,371	1,214
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,531	0,677	0,864	1,061	1,217	0,892	0,866	0,740
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,621	0,580	0,751	0,981	1,123	1,003	0,881	0,704
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,744	0,737	0,825	1,215	1,309	1,166	1,034	0,887
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,674	0,604	0,744	1,131	1,220	1,044	0,824	0,797
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,330	1,337	1,364	1,391	1,512	1,549	1,434	1,336
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,338	1,329	1,381	1,455	1,496	1,533	1,417	1,319
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,365	1,338	1,344	1,468	1,484	1,506	1,401	1,297
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,322	1,298	1,368	1,440	1,486	1,506	1,408	1,304
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,358	1,316	1,374	1,431	1,478	1,487	1,369	1,307
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,342	1,327	1,384	1,443	1,508	1,542	1,425	1,361
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,341	1,349	1,377	1,461	1,500	1,519	1,389	1,327
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,332	1,347	1,335	1,411	1,497	1,510	1,433	1,356
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,292	1,256	1,130	1,247	0,704	1,085	1,102	0,386
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,619	0,793	0,907	1,085	1,120	0,978	0,828	0,788
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,450	0,605	0,569	0,535	0,500	0,531	0,607	0,681

Valores médios de duas leituras

4.3. Avaliação do crescimento de *Lactobacillus* em diferentes temperaturas

Os *Lactobacillus* são bactérias ácido lácticas homofermentativas termofílicas amplamente utilizadas na indústria (CAGNO *et al.*, 2006). Prasad, McTarrow e Gopal (2003), ressaltam a importância de se estudar os efeitos de parâmetros dos processos industriais sobre o desempenho e sobrevivência destas espécies em diferentes temperaturas

Desta forma, nesta etapa do presente trabalho foi avaliado o crescimento das respectivas de *Lactobacillus* à temperaturas de 15° C, 37° C e 45° C, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.3. Conforme adotado nos ensaios anteriores considerou-se como crescimento satisfatório as culturas que apresentaram valores de DO superiores a 0,412 correspondendo a uma população de $1,05 \times 10^8$ UFC/mL. Observa-se que apenas a cepa *L. plantarum* Lac 40 apresentou crescimento satisfatório a 15 °C. Por outro lado, nota-se ainda que 95% das respectivas cepas cresceram satisfatoriamente a 37°C, destacando-se as cepas Lac 01 e 18 que apresentaram desempenho inferior nesta temperatura. No tocante ao desempenho destas cepas na temperatura de 45°C verifica-se que apenas a cepa *L. fermentum* Lac 13 apresentou crescimento satisfatório. Segundo Klaenhammaer e Kuller (1999), microrganismos que apresentam propriedades probióticas devem sobreviver às condições impostas pelo TGI, entre elas a temperatura de 37°C.

Tabela 4.3. Valores de DO₆₀₀ referentes ao crescimento das cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS/24 horas em diferentes temperaturas.

Cepas	Código	Temperaturas		
		15°C	37°C	45°C
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	-0,006	0,395	-0,003
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	-0,003	1,254	-0,006
<i>L. casei</i>	Lac 03	-0,002	0,992	-0,005
<i>L. casei</i>	Lac 04	-0,001	1,275	-0,005
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,015	0,467	0,218
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,008	1,185	0,021
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,015	1,003	-0,005
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	-0,006	0,876	0,260
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,006	0,857	0,316
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	-0,006	0,844	0,366
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	-0,015	0,841	0,033
<i>L. plantarum</i>	Lac 12	-0,014	0,962	0,250
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	-0,010	0,959	0,433
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,015	0,903	-0,016
<i>L. fermentum</i>	Lac 15	-0,009	1,265	0,360
<i>L. fermentum</i>	Lac 16	-0,015	1,039	0,360
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	-0,009	0,428	0,217
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	-0,004	0,301	0,255
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	0,007	1,252	-0,021
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	-0,013	0,624	0,176
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,028	0,627	0,295
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,016	1,050	-0,014
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	-0,012	1,170	0,100
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,011	1,153	-0,014
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,015	1,170	-0,015
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	-0,007	1,131	-0,015
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,062	0,610	0,295
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,054	0,667	0,255
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,009	0,712	0,221
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,041	0,609	0,244
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	0,018	1,250	-0,019
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	0,023	1,250	-0,018
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	0,046	1,090	-0,019
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,100	1,217	-0,023
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	0,000	1,288	-0,015
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	0,009	1,273	-0,018
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	0,026	1,330	0,044
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	0,008	1,317	0,093
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,016	1,074	-0,013
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,431	0,561	0,367
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,004	0,654	0,239

Valores médios de quatro leituras

Resultados semelhantes foram relatados por Pedersen *et al.* (2004) que demonstraram que todas as cepas de *Lactobacillus* testadas em suas pesquisas não apresentaram crescimento celular a temperatura de 15°C. Wiese *et al.* (1996)

utilizaram este parâmetro, bem como o crescimento à temperatura de 45°C para caracterização fenotípica das cepas de *L. panis*, *L. vaginalis*, *L. pontis* e *L. brevis*, e os resultados revelaram que apenas *L. pontis* foi capaz de crescer a temperatura de 15°C.

As bactérias do ácido láctico são microrganismos mesófilos, contudo, algumas cepas de *Lactobacillus* apresentam genes que são mais expressos na temperatura de 10°C, garantindo a sobrevivência destas cepas nestas condições de estresse (WOUTERS *et al.*, 2001).

Segundo Wang, Corrieu e Beal (2005), algumas espécies de bactérias do ácido láctico são induzidas, em baixas temperaturas, à síntese de proteínas, como CspA e CspI. Estes autores também afirmam em suas pesquisas a formação de uma outra resposta adaptativa induzida em ambientes de baixa temperatura, consistindo em um aumento de ácidos insaturados pesados, presentes na membrana fosfolipídica celular bem como sua fluidez. Com o aumento da temperatura ocorre ao contrário, isto é, diminui a presença dos ácidos insaturados pesados na composição da membrana celular (GUERZONI; LANCIOTTI; COCCONCELLI, 2001).

4.4. Avaliação do crescimento das cepas de *Lactobacillus* em diferentes condições de pH

Segundo Fayol-Messaoudi, *et al.* (2005) o mecanismo referente a atividade antagonista promovida por cepas de *Lactobacillus* parece ser de origem multifatorial, incluindo a capacidade de promover a redução do pH e produção de ácido láctico. O pH interno da célula é crítico para o controle de muitos processos celulares, como a síntese de ATP, RNA e proteínas, replicação do DNA e crescimento celular. Desta forma a capacidade de regulação do pH interno em relação ao pH externo é

fundamental para a sobrevivência e manutenção da viabilidade dos microrganismos (GUTIERREZ *et al.*, 2002). Desta forma, no presente trabalho avaliou-se o crescimento das cepas de *Lactobacillus* em estudo em caldo MRS a valores de pH 3,0; 5,0; 6,0 e 7,0, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.4. Considerou-se como crescimento celular satisfatório as culturas que apresentaram valores de DO superiores a 0,412, correspondendo a uma população superior a $1,05 \times 10^8$ UFC/mL.

Observa-se que nenhuma das cepas avaliadas se desenvolveu em meio a pH 3,0. Nota-se ainda que aproximadamente 30% destas cepas não apresentaram crescimento satisfatório em meio a pH 5,0, destacando-se dentre estas Lac 01, 03, 05, 14, 17, 27, 28, 29, 30, 39, 40 e 41 (cepa referência). No que se refere ao desempenho das respectivas cepas em meio a pH 6,0 e 7,0, nota-se que 30% e 12% das cepas, respectivamente, não apresentaram crescimento satisfatório. Os resultados permitem observar ainda que as cepas, identificadas como Lac 01, 03, 05 e 27 não apresentaram desempenho satisfatório em nenhuma das condições de pH avaliadas.

Giraud, Lelong e Raimbault (1991), estudando a velocidade específica de crescimento de cepas de *Lactobacillus*, em meio a pH variando de 4,0 a 8,0 a temperatura de 30°C, demonstraram que a maior velocidade específica de crescimento foi obtida no pH 6,0.

Gilliland e Rich (1990), estudando a estabilidade celular de cepas de *Lactobacillus* em leite, mantidas sob temperatura de 5°C, em diferentes condições de pH (5.5; 6.0; 6.5; 7.0), durante um período de 21 dias, demonstraram que as respectivas cepas apresentaram maior estabilidade a pH 5,0.

Tabela 4.4. Valores de DO₆₀₀ referente ao crescimento das cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS/24 horas em diferentes condições de pH.

Cepas	Código	pH			
		3,0	5,0	6,0	7,0
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,002	0,131	0,037	0,109
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	0,003	1,030	1,248	1,321
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,002	0,022	0,289	0,311
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,004	1,072	1,229	1,289
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,003	0,046	0,348	0,301
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,003	1,134	1,185	1,162
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,004	1,051	1,132	1,099
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,003	0,629	0,746	0,874
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,002	0,769	0,935	0,946
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,006	0,582	0,818	0,888
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	-0,005	0,611	0,800	0,840
<i>L. plantarum</i>	Lac 12	-0,002	0,699	0,784	0,881
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	-0,002	0,700	0,792	0,898
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,004	0,269	0,945	0,634
<i>L. fermentum</i>	Lac 15	0,000	1,031	1,215	1,257
<i>L. fermentum</i>	Lac 16	-0,007	0,549	0,764	0,890
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	-0,003	0,044	0,225	0,462
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	-0,004	0,490	0,166	0,373
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	-0,002	1,060	1,196	1,239
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,000	0,653	0,031	0,434
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	-0,004	0,866	0,822	0,553
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,002	0,831	1,210	0,767
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	-0,002	1,081	1,089	1,140
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,001	1,159	1,252	1,198
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,006	1,098	1,242	1,285
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	0,000	1,123	1,130	0,984
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	-0,003	0,227	0,106	0,334
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	-0,004	0,238	0,180	0,464
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	-0,003	0,278	0,038	0,505
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,001	0,000	0,065	0,410
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	-0,012	1,195	1,237	1,360
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	-0,008	1,215	1,266	1,299
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	-0,006	0,979	1,173	1,004
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	-0,012	0,971	1,044	0,840
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	-0,010	1,073	1,261	0,985
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	-0,011	1,211	1,291	1,326
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	-0,011	1,189	1,260	1,378
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	-0,009	1,079	1,252	1,407
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,009	-0,012	0,263	0,419
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	-0,015	-0,002	0,034	0,517
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	-0,004	0,001	0,455	0,533

Valores médios de quatro leituras

Os resultados obtidos no presente trabalho são compatíveis com aqueles reportados na literatura. Assim, Blickstad (1983), estudando o processo de fermentação anaeróbia de glicose por cepas de *Lactobacillus*, demonstraram que a melhor condição para produção de ácido láctico ocorreu em meio a pH 5.8 ± 0.5 , obtendo um rendimento médio de 0,93 grama de ácido láctico (isômeros D- e L-) por grama de glicose consumida.

4.6. Produção de ácido láctico

Dentre as características de um microrganismo que apresenta propriedades probióticas, destaca-se a formação de ácidos orgânicos que interferem na competição no TGI e no efeito de inibição sobre o desenvolvimento de espécies patogênicas (KLAENHAMMER; KULLEN 1990). A produção de ácido láctico é uma característica de espécies de *Lactobacillus*, refletindo em efeito de inibição sobre a ação de certos microrganismos (BLICKSTAD, 1983). Desta forma, no presente trabalho avaliou-se a produção de ácido láctico pelas cepas testadas em caldo MRS em diferentes tempos de fermentação e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.5.

Observa-se que 54% e 20% das cepas de *Lactobacillus* avaliadas produziram acima de 2,0 g/L e 3,0 g/L de ácido láctico após 12 e 24 horas de fermentação, respectivamente. Considerando a concentração inicial de glicose (20,0 g/L) no caldo MRS e o fator de conversão teórico de glicose em ácido láctico ($Y_{p/s} = 1,0$ g/g) nota-se que houve baixa produção deste ácido devido, provavelmente, ao curto tempo de fermentação.

Tabela 4.5. Concentração de ácido láctico (g/L) em diferentes tempos de fermentação.

Cepas	Código	Tempo de Fermentação		
		0 h	12 h	24 h
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,72	1,51	2,91
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,00	1,49	3,44
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,00	2,18	2,81
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,21	2,21	3,51
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	1,07	1,63	1,38
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,98	2,47	3,47
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,18	2,28	2,60
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,25	2,48	2,60
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	1,14	2,28	2,54
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,10	2,31	2,77
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	1,10	1,90	2,53
<i>L. plantarum</i>	Lac 12	1,06	1,72	2,52
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,40	2,17	2,57
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,10	2,43	2,86
<i>L. fermentum</i>	Lac 15	1,15	3,06	3,54
<i>L. fermentum</i>	Lac 16	1,09	1,03	1,94
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	1,19	1,75	2,19
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	1,10	1,60	2,07
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,03	2,05	3,57
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	1,07	1,58	1,07
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	1,00	1,39	0,98
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,12	2,44	3,10
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,02	2,15	2,07
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,06	1,47	2,33
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,07	1,45	2,58
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,08	1,45	1,52
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	1,24	1,74	1,62
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	1,14	1,12	1,22
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	1,15	1,88	1,30
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	1,22	1,79	1,23
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,11	2,60	1,42
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,15	2,79	2,41
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,15	2,84	2,55
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,16	2,62	1,97
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,14	2,71	2,11
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,14	2,79	2,52
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,14	2,53	2,43
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,11	2,77	3,32
<i>L. agilis</i>	Lac 39	0,83	2,84	2,47
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,00	1,82	1,32
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,81	0,05	3,27

4.7. Seleção das cepas de *Lactobacillus*

Na seleção de cepas propriedades probióticas, diversos critérios devem ser considerados, destacando-se aspectos de biossegurança, de produção e processamento de alimentos, métodos de administração e sobrevivência às condições do TGI e colonização do hospedeiro (GUILLIAND; WALKER, 1990). Reafirmando assim, as chaves de pesquisa da indústria, que são: aumento na eficiência de processamento; utilizar componentes de interação na formulação do alimento; promover estratégias de controle de doenças e desenvolver alimentos que promovem melhorias na saúde (KLAENHAMMER; KULLEN 1999).

Considerando os critérios de avaliação de desempenho das cepas de *Lactobacillus*, no presente trabalho, verifica-se na Tabela 4.6 que sete (18,0 %) das respectivas cepas apresentaram desempenho satisfatório na diferentes condições avaliadas. Desta forma, estas cepas foram avaliadas quanto à capacidade de promover antagonismo sobre espécies consideradas patogênicas, bem como quanto a capacidade de se manter ativas quando armazenadas em leite reconstituído a 4°C por um período de 30 dias.

Segundo Pedersen *et al* (2004), os critérios empregados para selecionar microorganismos probióticos ainda não estão claramente estabelecidos. Assim, Klaenhammer e Kuller (1999) compilaram os resultados de 20 anos de pesquisas, objetivando estabelecer um perfil dos critérios adotados para seleção de cepas com propriedade probióticas. Estes autores demonstraram que muitos desses critérios consistem em considerar o habitat de origem das respectivas cepas, propriedades patogênicas, manutenção de viabilidade celular alta ($10^6 - 10^8$ UFC/mL), mantendo suas características durante a preparação e estocagem dos alimentos, capacidade de

Tabela 4.7. Características das cepas selecionadas

Cepas	Código	Critérios de Seleção			
		NaCl	Sais Biliares	37°C	pH 5,0
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	N	N	N	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	N	S	S	S
<i>L. casei</i>	Lac 03	N	N	S	N
<i>L. casei</i>	Lac 04	S	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	S	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	S	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	S	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	N	N	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	S	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	N	N	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	N	N	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 12	N	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	N	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	N	S	S	N
<i>L. fermentum</i>	Lac 15	N	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 16	N	N	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	N	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	N	S	N	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	S	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	N	N	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	S	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	N	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	S	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	N	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	N	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	S	S	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	N	S	S	S
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	N	S	S	S
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	S	S	S	S
<i>L. agilis</i>	Lac 39	N	N	S	N
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	S	S	S	N
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	S	N	S	N

N = Não Selecionada S= Selecionada

sobreviver, proliferar e manter a capacidade metabólica no hospedeiro e possuir propriedades que tragam benefícios ao hospedeiro como apresentar efeito

antagonista sobre espécies de microrganismos patogênicos. Desta forma, salienta-se que as sete cepas selecionadas no presente trabalho apresentam potencial para serem avaliadas no desenvolvimento de preparações probióticas para uso humano e animal.

4.8. Efeito antagônico das cepas de *Lactobacillus* sobre cepas patogênicas

Nas últimas décadas tem se estudado formas de manipulação da microbiota intestinal mediante a administração de produtos probióticos com vistas a prevenção e tratamento de algumas patologias humanas (LARA-VILLOSLADA *et al.*, 2007). Assim, dentre os critérios empregados para a seleção de um microrganismo probiótico, destaca-se o efeito de exclusão competitiva que compreende, principalmente, a ocupação de sítios de adesão de patógenos por parte dos microrganismos probióticos, resultando na normatização da microbiota intestinal (SANTOS; TURNES, 2005).

Tendo em vista que o efeito de exclusão competitiva é uma importante característica dos microrganismos probióticos, no presente trabalho avaliou-se o efeito antagonista das cepas previamente selecionadas sobre crescimento de *Salmonella tiphy*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Neste experimento, as cepas de *Lactobacillus* selecionadas foram repicadas em ágar MRS por profundidade e, as colônias formadas foram cobertas com meio BHI semi-sólido contendo 1% de células das respectivas espécies patogênicas, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 4.8. O efeito antagonista exercido por estas cepas sobre espécies patogênicas foi verificado por meio da formação de um halo de inibição.

Observa-se que *Salmonella typhi* foi fortemente inibida por todas as cepas selecionadas frente as outros patógenos testados. Nota-se ainda que o efeito de inibição destas cepas sobre as espécies patogênicas estudadas foi superior àquele observado para a cepa *L. delbrueckii* UFVH2B20, empregada como referência. Entre as cepas testadas observa-se que as cepas *L. plantarum* Lac 06 e *L. fermentum* Lac 38, destacaram-se quanto ao efeito de inibição do crescimento das cepas patogênicas em questão

Segundo informações do Ministério da Saúde (2007) no ano de 2006, no Brasil foram registrados 504 casos de salmonelose, com quatro mortes e de janeiro a outubro, 326 casos de febre tifóide. Informativos do Instituto Oswaldo Cruz (2007) relatam a ocorrência de surtos de listeriose pelo mundo na década de 80, destacando-se maior ocorrência em países desenvolvidos como Canadá, Estados Unidos e Suíça, devido a um maior consumo de alimentos industrializados.

De acordo com Felício (2004), dois casos de infecção por *Escheichia coli* O157:H7 em humanos foram reportados na Argentina, e no Brasil sua presença foi detectada no Estado de São Paulo.

Tabela 4.8. Valores (mm) dos halos de inibição das cepas de *Lactobacillus* selecionadas sobre espécies patogênicas

Espécies	Código	Patogenos		
		<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. casei</i>	Lac 04	16,5	9,5	8,5
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	20,5	10,0	19,0
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	16,5	6,0	7,0
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	10,0	3,0	6,0
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	17,5	7,0	7,0
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	19,5	4,5	7,5
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	20,5	8,5	10,5
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	6,5	3,0	2,5

Estudos realizados por Pascual *et al.*, (1999), *in vivo* desmonstraram que cepas de *Lactobacillus salivarius* são capazes de reduzir significativamente a capacidade de colonização de cepas de *Salmonella enteritidis* em galinhas, reafirmando assim o efeito de antagonismo observado no presente trabalho.

Guerra e Bernado (2001) isolaram 12 cepas de *Lactobacillus* de amostras de queijo, e avaliaram o efeito antagônico destas cepas sobre *Listeria monocytogenes*. Os resultados confirmaram a existência do efeito antagonista exercido pelas cepas testadas e os autores atribuíram ao efeito observado como decorrente da produção de ácidos orgânicos e de peróxido de hidrogênio.

Pereira e Gómez (2007) estudaram o efeito de inibição de *Lactobacillus acidophilus* sobre o crescimento de uma cepa de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de casos clínicos humanos. Os resultados revelaram a formação de halos de inibição de 15,5 mm de diâmetro, confirmando, assim, o potencial do efeito antagonista exercido por cepas de *Lactobacillus*, conforme observado no presente trabalho.

4.9. Viabilidade celular das cepas de *Lactobacillus*

Segundo a ANVISA (2007) no que se refere ao número de células viáveis presentes em produto probiótico, estabeleceu-se que o consumo diário deve ser de 10^8 a 10^9 UFC. Assim, no presente trabalho as cepas de *Lactobacillus* Lac 06, 38, que apresentam efeito antagônico positivo, e UFV H2B20 foram avaliadas quanto à manutenção da viabilidade celular em leite reconstituído, após 24 horas de fermentação à 37°C, ao armazenamento à 4°C durante 29 dias. Para tanto se determinou a população de células (UFC/mL) e a acidez titulável, expressa em ácido

lático, ao longo deste período e os resultados encontram-se representados na Figura 4.1

Observa-se (Fig. 4.1 A) um aumento na população de células nas primeiras 24 horas referentes ao período de fermentação. Nota-se ainda que, após este período, as cepas Lac 06, 38 e UFV H2B20 mantiveram níveis celulares correspondentes a aproximadamente $5,1 \times 10^7$ UFC/mL; $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e $1,7 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente, ao longo do experimento. Ressalta-se que estes valores atendem aos padrões estabelecidos pela ANVISA e demonstram que estas cepas poderiam ser empregadas para a produção de “leite acidófilo doce”.

Por outro lado, no tocante à produção de ácido láctico (Fig. 4.1 B), observa-se um aumento na concentração após os primeiros 4 dias de estocagem, correspondendo a aproximadamente 53% para as cepas Lac 06 e 38 e 106% para UFV H2B20, mantendo-se constantes até o final do experimento. Esta propriedade é importante no sentido de se avaliar a utilização das respectivas cepas para a fabricação de “leite acidófilo doce”. Assim, os níveis de ácido láctico observados no presente trabalho revelam que estas cepas não se prestam para a obtenção do referido produto, uma vez que o leite contendo acima de 1,8 g/L de ácido láctico se torna impróprio para o consumo.

Segundo Siqueira (2007) a acidez natural do leite se deve à presença de caseína, sais minerais e íons, podendo oscilar de 1,2 a 1,8 g/L, expressa em ácido láctico.

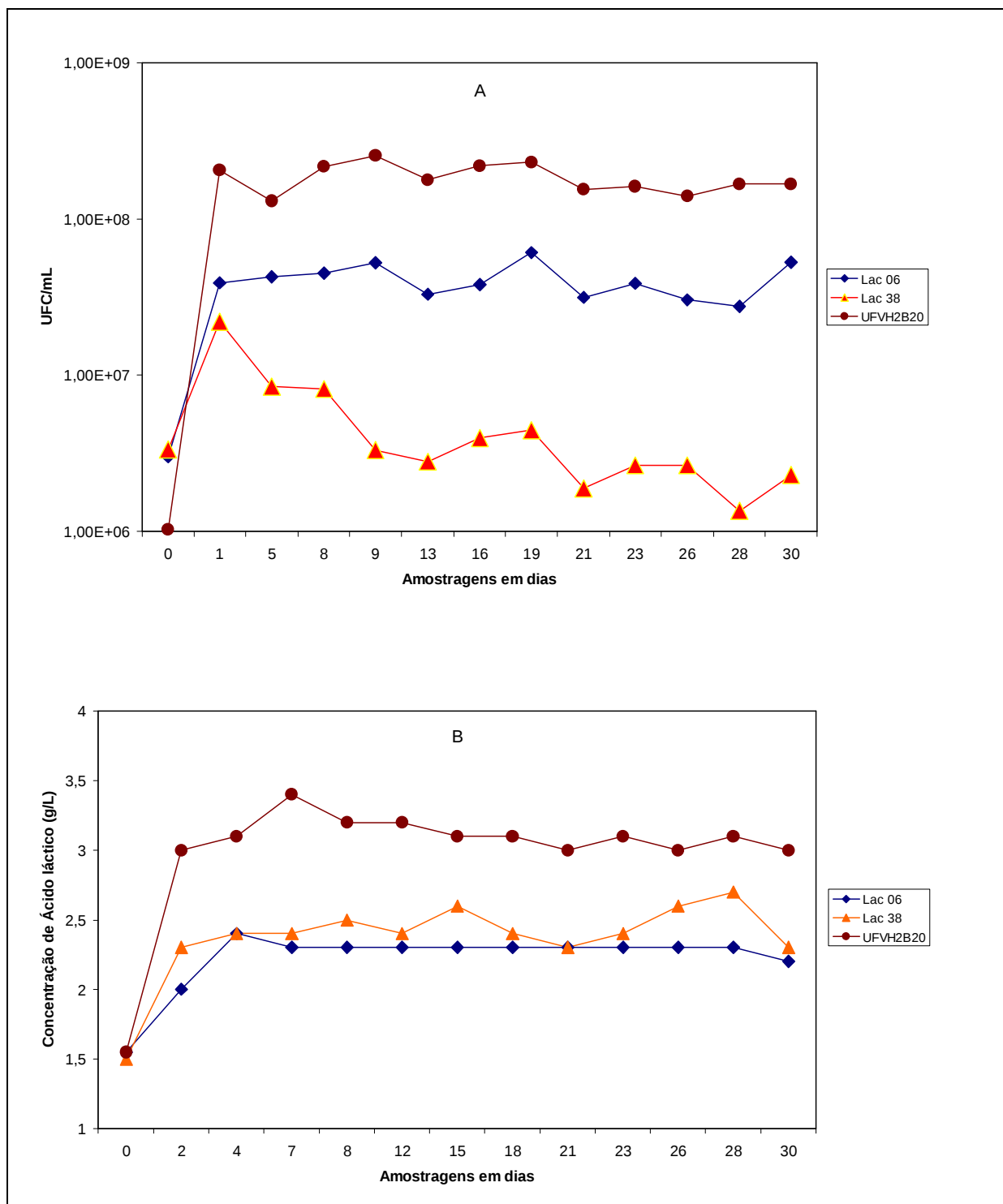


Figura 4.1. Variação da Viabilidade celular (A) e concentração de ácido láctico (B) ao longo do tempo de estocagem a 4°C.

A fermentação de leite por bactérias do ácido láctico é caracterizada pela parcial utilização dos nutrientes presentes no mesmo, principalmente a lactose, dando origem a ácidos orgânicos, entre eles o ácido láctico, acético e propiônico, que por sua vez aumentam a acidez do meio (FARIA; BENEDET; GUERROUE, 2006).

Figueredo *et al.* (2004) em um estudo utilizando a cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2B20 não observaram variações na concentração de ácido láctico, bem como na viabilidade celular à temperaturas abaixo dos 10°C, por um período de 6 dias.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- Dentre as 40 cepas de *Lactobacillus* avaliadas foi possível selecionar sete que apresentaram crescimento satisfatório quando submetidas às diferentes condições na presença de NaCl, sais biliares, temperatura, pH, bem como no tocante a produção de ácido láctico.

- As cepas selecionadas apresentaram efeito antagônico sobre espécies patogênicas como *Salmonella tiphy*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, superior ao observado para a cepa referência.

- Durante 29 dias a 4°C, após 24 horas de fermentação em leite reconstituído algumas cepas pré-selecionadas mantiveram a viabilidade celular satisfatória. No entanto a produção de ácido láctico observada neste período impede a utilização das referidas cepas a produção de “leite acidófilo doce”.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANDRIGHETTO, C.; GOMES, V. M. I. F. Produção de picolé utilizando leite acidófilo. **Braz. J. Food Technol**, v. 6, n. 2, p. 267-271. 2003.
- ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**; lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 22 set. 2007.
- ANVISA. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**; Norma Aprovada—Sexta Edição. v.23, n. 2, 81p. 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em 19 nov. 2005.
- ASAHARA, T.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. Probiotic Bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* 0157:H7. **Infect. Immun.** v. 72, n.4, p. 2240-2247. 2004.
- AZCARATE-PERIL, M. A.; ALTERMAN, E.; HOOVER-FETZULA, R. L.; CANO, R. J.; KLAENHAMMER, T. R. Identification and inactivation of gene loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 9, p. 5315-5322, 2004.
- BARRETO, G. P. M.; SILVAS, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Braz. J. Food Technol.** v. 6, n. 1. p. 119-126, 2003.
- BEGLEY, M. GAHAN, C. G. M.; HILL, C. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, cross-protection, and identification of gene loci involved in bile resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, n. 12, p. 6005-6012, 2002.
- BENGMARCK, S.; ORTIZ DE URBINA, J. J. Simbióticos: uma nueva estrategia em el tratamiento de pacientes críticos. **Nutr. Hosp.** v. 2, n.20, p. 147-156, 2005.
- BLICKSTAD, E. Growth and End Product Formation of Two Psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509^T at Different pH

- Values and Temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 46, n. 6, p. 1345-1350. 1983.
- BRANDTZAEG, P. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 964, p. 13-45, 2002.
- BRIZUELA HERRADA, M. A. **Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos.** 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). ICIDCA- Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- BRIZUELA, M. A.; SERRANO, P.; PÉREZ, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 44, n.1, p. 95-99. 2001.
- BRON, P. A.; MARCO, M.; HOFFER, S. M.; MULLEKOM, E. V.; VOS, W. M.; KLEEREBEZEM, M. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. **J. Bacteriol.** v. 186, n. 23, p. 7829-7835, 2004.
- CAGNO, R. D.; AMGELIS, M. D.; LIMITONE, A.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 7, p. 4503-4514, 2006.
- CATANZARO, J. A. N. D.; GREEN, L. B. S. Microbial Ecology and Probiotics in Human Medicine (Part II). **Altern. Med. Rev.** v. 2, n. 4, p. 296-305. 1997.
- COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural.** v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 10, p. 5929-5936. 2004.
- DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutr. J.** v. 19, n. 3, p. 1-21. 2004.
- DRAKES, M.; BLANCHARD, T.; CZIN, S. Bacterial probiotics modulation of dendritic cell. **Infect. Immun.** v. 72, n. 6, p. 3299-3309, 2004.
- DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 4, p. 2161-2171. 2004.

- ERICKSON, K. L.; HUBBARD, N. E. Probiotic immunomodulation in health and disease. **J. of Nutr.** v. 130, n. 2, p.403-409. 2000.
- ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; BEIRÃO, L. H.; SANT'ANNA, E. S.; DALCIN, E. B.; FRANCO, B. G. M. Bacteriocinogenic effect of *Lactobacillus sakei* 2a on microbiological quality of fermented *Sardinella brasiliensis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 46, n. 4, p. 553-561. 2003.
- FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. Creating and maintance the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.** v. 62, n. 4, p. 1157-1170. 1998.
- FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. Analise de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei* e suplementado com *Bifidobacterium longum*. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 27, n. 3, p. 407-414, 2006.
- FAYOL-MESSAOUDI, D.; BERGER, C. N.; COCONNIER-POLTER, M. H.; MOAL, V. L. L.; SERVIN, A. L. pH⁻, Lactic Acid⁻, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium. **Appl. Environ. Micobiol.** v. 71, n. 10, p. 6008-6013. 2005.
- FELÍCIO, P. E. A carne tropical é livre de *Escherichia coli* 0157:H7?. **Rev. A.B.C.Z.** n. 22, p. 98, 2004.
- FIGUEIREDO, H. M.; PASSOS, F. J. V.; MORAES, C. A.; PASSOS, F. M. L. TEIXEIRA, M. A. Produção de leite não-fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* UFVH2B20 isolado no Brasil. **Braz. J. Food Technol.** v. 7, n. 2, p. 139-144, 2004.
- GILLILAND, B. E.; WALKER, D. K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. **Dairy Sci.** v. 73, p. 905-911, 1990.
- GILLILAND, S. E.; RICH, C. N. Stability During Frozen and Subsequent Refrigerated Storage of *Lactobacillus acidophilus* Grown at Different pH. **Journal of Dairy Science.** v. 73, n. 5, p. 1187-1192. 1990.
- GIRAUD, E.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 96-99, 1991.
- GRANATO, D.; BERGONZELLI, G. E.; PRIDMORE, D. R.; MARVIN, L.; ROUVET, M.; THEULAZ, I. E. C. Cell surface-associated elongation factor tu mediates the

- attachment of *Lactobacillus jhonsonii* NCC533 (La1) to human intestinal Cells and mucins. **Infect. Immun.** v. 72, n. 4, p. 2160-2169, 2004.
- GRANGETTE, C. ; MU, H. ; ALOUF, L. ; GOUDERCOURT, D. ; GEOFFROY, M. C.; TURNER, M.;MERCENIER, A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization whit recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infect. Immun.** v. 69, n. 3, p. 1547-1553, 2001.
- GROSSO, C. R. F.; TRINDADE, C. S. F. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, p. 151-156. 2004.
- GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de manutenção de queijos Alentejo. **R.P.C.V.**, v. 538, n. 96, p. 56-69, 2001.
- GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; COCCONELLI, P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiol.** v. 147, p. 2255-2264, 2001.
- GUTIÉRREZ, R. C.; SANTOS, V.; CECILIA, M.; SILVA, C.; NADER-MACÍAS, M. E. Effect of ampicillin on the kinetics of colonization of *Streptococcus pneumoniae* and *Lactobacillus fermentum* in the respiratory tract of mice. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** v. 23, n. 3, 10p. 2004.
- HADDADIN, M. S. Y.; AWAISHEH, S. S.; ROBINSON, R. K. The production of yoghurt with probiotic bacteria isolated from infants in Jordan. **Pak. J. Nutr.** v. 5, n. 3, p. 290-293. 2004.
- HAULY, M. C. O.; NOGUEIRA, R. B.; OLIVEIRA, A. S. Influência do NaCl e do NaNO₂ sobre a fermentação láctica desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus* em meio MRS. **Semina: Ci. Exatas Tecnol.**, v. 22, p. 37-41, 2001.
- HUGHES, A. D.; ROCHAT, F.; SERRANT, P.; AESCHLIMANN, J. M.; SCHIFFRIN, E. J. Modulation of nonspecific mechanism of defense by lactic acid bacteria: effective dose. **J. Dairy Sci.** v. 82, p. 863-869. 1999.
- HUTKINS, R. W.; NANNEN, N. L. pH homeostasis in Lactic Acid Bacteria, **J. Dairy Sci.** v. 76, n. 8, p. 2354-2365. 1993.
- INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Noícias IOC:Estudos iniciados em 1969 traça panorama da listeriose no Brasil.** Disponível em

- <<http://sites.ioc.fiocruz.br/ioc/informerede/corpo/noticia/2006>>. Acesso em 23 set. 2007.
- ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 73, p. 1142-1146, 2001.
- ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 73, p. 444-450, 2001.
- JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PAERREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.
- JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P. V.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 8, n. 2, p. 293-296, 2001.
- KAMINOGAWA, S.; NANNO, M. Modulation of immune functions by foods. **CAM.** v. 3, p. 241-250, 2004.
- KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F. K.; MOLLER, P. L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v. 36, p. 1037-1046, 2003.
- KLAENHAMMER, T. R.; KLEEMAN, E. G. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 41, n. 6, p. 1461-1467, 1981.
- KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p. 45-57, 1999.
- LARA-VILLOSLADA, F.; SIERRA, S.; BOZA, J.; XAUS, J.; OLIVARES, M. Efectos beneficiosos en niños sanos del consumo de un producto lácteo que contiene dos cepas probióticas, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT5714. **Nutr. Hosp.** v.22, n.4, p. 496-502, 2007.
- MA, D.; FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infect. Immun.** v. 72, n. 9, p. 5308-5314, 2004.

- MACIEL, J. F.; TEIXEIRA, M. A.; MORAES, C. A.; GOMIDE, L. A. M. Antibacterial activity of lact cultures isolated of italian salami. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, n. 1, p. 121-122. 2003.
- MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.
- MARCEAU, A.; ZAGOREC, M.; CHAILOU, S.; MÉRA, T.; VERGÈS, M. C. C. Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 12, p. 7260-7268. 2004.
- MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. **Braz. J. Microbiol.** v. 32, n. 1, p. 32-37. 2001.
- MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, S. M.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, N. J. Resistance of lactic acid bacteria pig isolated in faeces and their antagonistic capacity against indicative microorganisms. **Rev. Cien. Agrov.** v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.
- MCDONALD, L.C.; FLEMING, H. P.; HASSAN, H. M. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, n. 7, p. 2120-2124. 1990.
- MEYER, P. M.; PIRES, A. V.; BAGALDO, A. R.; SIMAS, J. M. C.; SUSIN, I. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. **Sci. Agric.** v. 58, n. 2. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Inundações aumentam risco de doenças**; Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>> Acesso em 22 set. 2007.
- MOLINA-GUTIERREZ, A.; STIPPL, V.; DELGADO, A.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. In Situ Determination of the Intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during Pressure Treatment. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, n. 9, p. 4399-4406. 2002.
- MOSER, S. A.; SAVAGE, D. C. Bile Salt Hydrolase Activity and Resistance to Toxicity of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties in Lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, n. 8, p. 3476-3480. 2001.

- NAVA, G. M.; DAVILA, M. Nuevas perspectivas en la selection and evaluation of probiotics. **Rer. Chil. Nutr.** v. 21, p. 184-185, 2004.
- NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; VIEIRA, G. O.; BORBA, L. M. Colostro humano: fonte natural de probióticos?. **J. Pediatr.** v. 4, n. 77, p. 265-270. 2001.
- OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23 (suppl), p. 172-176. 2003.
- ÖTLES, S., ÇAGINDI, Ö., AKÇIÇEK, E., Commentary: Probiotics and Health. **Asian Pacific J. Cancer Prev.** v. 4. p. 369-372. 2003.
- OYETAYO, V. O. Phenotypic characterization and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. **Afr. J. Biotechnol.** v. 3, n. 7, p. 355-357. 2004.
- OYETAYO, V. O., OYETAYO, F. L. Review: Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **Afr. J. Biotechnol.** v. 4, n. 2, p. 123-127. 2005.
- PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J. I.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, n. 11, p. 3189-3194, 1999.
- PEDERSEN, C.; JONSSON, H.; LINDBERG, J. E.; ROOS, S. Microbiological characterization of wet wheat distillers' grain, with focus on isolation of lactobacilli with potential as probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 3, p. 1522-1527, 2004.
- PEÑA, J. A.; LI, S. Y.; WILSON, P. H.; THIBODEAU, S. A.; SZARY, A. J.; VERSALOVIC, J. Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 1, p. 558-568. 2004.
- PERDIGON, G.; MACIAS, M. E. N.; ALVEZ, S.; OLIVER, G.; HOLGADO, A. A. P. R. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immun.** v. 53, n. 2, p. 404-410, 1986.
- PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias.** v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

- PIETERSE, B. Transcriptome analysis of the lactic acid and NaCl-stress response of *Lactobacillus plantarum*. 160 f. Dissertação (Doctor of Philosophy) – Wageningen University, Wageningen (Holanda), 2006.
- PLANT, L.; CONWAY, P. Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's patches in mice. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 8, n. 2, p. 320-324, 2001.
- PRADO, C. S.; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C. R.; MOREIRA, E. C.; COSTA, J. O. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian dry fermented sausages against *Listeria monocytogenes*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 52, n. 4, p. 417-423. 2000.
- PRAKASH, S.; JONES, M. L. Artificial cell therapy: new strategies for the therapeutic delivery of live bacteria. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 1, n. 1, p. 44-56. 2005.
- PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. **Int. Dairy Journal.** v. 8, p. 993-1002. 1998.
- PRASAD, J.; McJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, n. 2, p. 917-925, 2003.
- PRIDMORE, R. D.; BERGER, B.; DESIERE, F.; VILANOVA, D.; BARRETTO, C.; PITTET, A. C.; ZWAHLEN, M. C.; ROUVERT, M.; ALTERMANN, E.; BARRANGOU, R.; MOLLET, B.; MERCENIER, A.; KLAENHAMMER, T.; ARIGONI, F.; SCHELL, M. A. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **PNAS.** v. 101, n. 8, p. 2512-2517, 2004.
- PRIOULT, G.; PECQUET, S.; FLISS, I. Stimulation of interleukin-10 production by acidic β -lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 11, n. 2, p. 266-271, 2004.
- RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T. R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I. R.; SANDERS, M. E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology.** v. 52, p. 145-152. 2005.
- REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, n. 9, p. 3763-3766, 1999.

- REQUE, E. F.; PANDEY, A.; FRANCO, S. G.; SOCCOL, C. R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Braz. J. Microbiol.** v. 31, n. 1, p. 303-307. 2000.
- RIBEIRO, M. A. Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. 1995. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). **Universidade Federal de Viçosa**.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.** n. 76 (suppl). p. 361S-364S. 2001.
- RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **Int. Journal of Food Microbiol.** v. 83, p. 63-74. 2003.
- SANTOS, J. R. G.; TURNES, C. G. Probiótico em avicultura. **Ciência Rural.** v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.
- SIQUEIRA, I. N. **Características físico-químicas e pesquisa de resíduos de antibióticos no leite de cabra cru nas Mini-usinas do Cariri Paraibano** 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2007.
- SMITS, H. H.; ENGERING, A.; VAN DER KEIJ, D.; JONG, E. C.; SCHIPPER, K.; VAN CAPEL, T. M. M.; ZAAT, B. A. J.; YAZDANBAKHSH, M.; WIERENGA, E. A.; VAN KOOYK, Y.; KAPSENBERG, M. L. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 115, n.6, p. 1260-1267. 2005.
- TANNOCK, G. W. A special fondness for Lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, n. 6, p. 3189-3194. 2004.
- THANASSI, D. G.; CHENG, L. W.; NIKAIDO, H. Active efflux of bile salt by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 8, p. 2512-2518, 1997.
- WAGNER, R. D.; PIERSON, C.; WARNER, T. ; DOHNALEK, M.; FARMER, J.; ROBERTS, L.; HILTY, M.; BALISH, E. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. **Infect. Immun.** v. 65, n. 10, p. 4165-4172. 1997.

- WANG, Y.; CORRIEU, G.; BÉAL, C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **J. Dairy Sci.** v. 88, p. 21-29, 2005.
- WEESE, J. S. ANDERSON, M. E. C.; LOWE, A.; MONTELTH, G. J. Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. **Can. Vet. J.** v. 44, p. 299-302. 2003.
- WEHKAMP, J.; HARDER, J. ; WEHKAMP, K.; WEHKAMP-VON MEISSNER, B.; SCHLEE, M.; ENDERS, C.; SONNENBORN, U.; NUDING, S.; BENGMARK, S.; FELLERMANN, K.; SCHRÖDER, J. M.; SANGE, E. F. NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. **Infect. Immun.** v. 72, n. 10, p. 5750-5758, 2004.
- WIESE, B.; STROHMAR, W.; RAINEY, F. A.; DIEKMANN, H. *Lactobacillus panis* sp. nov., from Sourdough with a long fermentation period. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 46, n. 2, p. 449-453, 1996.
- WILKS, M.; WIGGINS, R.; WHILEY, A.; HENNESSY, E.; WARWICK, S.; PORTER, H.; CORFIELD, A.; MILLAR, M. Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 2, p. 713-717. 2004.
- WOLF, B. W.; WHEELER, K. B.; ATAYA, D. G.; GARLEB, K. A. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. **Food Chem. Toxicol.** v. 36, p. 1085-1094, 1998.
- WOUTERS, J. A.; FRENKIEL, H.; VOS, W. M.; KUIPERS, O. P.; ABEE, T. Cold shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG 1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, n. 11, p. 5171-5171, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A. AVALIAÇÃO COM CONCENTRAÇÕES DE NaCl

Nas tabelas a seguir estão os valores de absorvância obtidas de experimentos com a adição de NaCl variando de 0 a 15%. Tais ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela A.1. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h, controle.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	1,0398	1,0788	1,0593
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3525	1,3722	1,3624
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,1352	1,0464	1,0908
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3370	1,3602	1,3486
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,4654	0,5942	0,5298
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3678	1,4270	1,3974
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,2952	1,2805	1,2878
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,1813	1,1811	1,1812
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,7237	0,6872	0,7055
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,9745	1,0306	1,0025
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	1,0629	1,0664	1,0647
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	1,0563	1,0440	1,0502
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,9559	1,0268	0,9913
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,1102	1,0959	1,1031
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3727	1,3891	1,3809
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,3120	1,3071	1,3096
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,4036	0,4443	0,4240
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,4356	0,4621	0,4489
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3174	1,3023	1,3098
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,4319	0,3846	0,4082
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,4144	0,3369	0,3756
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,2262	1,2465	1,2364
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3006	1,2860	1,2933
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2933	1,2814	1,2874
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3114	1,3162	1,3138
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,1380	1,2796	1,2088
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,6369	0,6729	0,6549
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,6962	0,7371	0,7166
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,8345	0,7988	0,8166
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,6670	0,6614	0,6642
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2180	1,3083	1,2632
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4838	1,4554	1,4696
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,3261	1,3512	1,3386
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,1194	1,0378	1,0786
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2912	1,2389	1,2651
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,4459	1,4331	1,4395
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3114	1,2762	1,2938
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4018	1,4065	1,4042
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,4683	1,4358	1,4520
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6722	0,7536	0,7129
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,6600	0,5669	0,6135

Tabela A.2. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 0,23% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	1,0123	1,0581	1,0352
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3731	1,4126	1,3929
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,1792	1,1924	1,1858
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,4202	1,3680	1,3941
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,3456	0,2258	0,2857
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3768	1,3911	1,3839
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3088	1,3322	1,3205
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,1831	1,1573	1,1702
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6995	0,6068	0,6532
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,0458	0,8722	0,9590
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,9061	1,0069	0,9565
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	1,0061	1,0239	1,0150
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,8901	0,9142	0,9021
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	0,9640	1,0649	1,0145
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3470	1,3722	1,3596
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,2564	1,2532	1,2548
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,4123	0,4040	0,4082
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,3938	0,3610	0,3774
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3521	1,3456	1,3488
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,3255	0,1370	0,2312
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,2174	0,2394	0,2284
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,2350	1,2029	1,2190
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3122	1,2989	1,3056
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,3116	1,2610	1,2863
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3264	1,2712	1,2988
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2039	1,3341	1,2690
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,5656	0,6772	0,6214
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,6127	0,6471	0,6299
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,7369	0,7041	0,7205
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,7286	0,5833	0,6559
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2740	1,2955	1,2848
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4298	1,4442	1,4370
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,1925	1,1708	1,1816
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,0535	1,0288	1,0412
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2300	1,2205	1,2253
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,4287	1,4458	1,4372
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3118	1,2801	1,2960
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4123	1,3867	1,3995
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,4669	1,4260	1,4464
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6238	0,6256	0,6247
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,6406	0,7371	0,6889

Tabela A.3. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 0,47% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	1,0397	1,0652	1,0524
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,2996	1,3641	1,3319
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,1169	1,1490	1,1329
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3740	1,3528	1,3634
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,3486	0,3274	0,3380
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4052	1,3767	1,3909
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3504	1,2650	1,3077
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,2470	1,0823	1,1647
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6839	0,6904	0,6872
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,1553	1,1435	1,1494
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,9558	0,9908	0,9733
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	1,0475	1,1054	1,0765
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,1342	1,1256	1,1299
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,0440	1,1723	1,1082
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3958	1,3375	1,3667
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,1864	1,2860	1,2362
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,3973	0,3765	0,3869
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,3374	0,4191	0,3783
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3391	1,3454	1,3422
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,6171	0,4098	0,5134
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,5819	0,3823	0,4821
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,1832	1,1768	1,1800
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3498	1,3226	1,3362
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2607	1,2231	1,2419
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3056	1,3042	1,3049
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2789	1,2719	1,2754
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,8012	0,7358	0,7685
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,8358	0,8143	0,8250
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,8663	0,8216	0,8439
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,6637	0,5919	0,6278
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2076	1,2238	1,2157
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4138	1,3926	1,4032
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,2324	1,2784	1,2554
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,1179	1,0519	1,0849
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2313	1,1387	1,1850
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3915	1,4244	1,4079
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,2818	1,2650	1,2734
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4226	1,4090	1,4158
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,4330	1,4207	1,4268
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6943	0,7184	0,7063
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,6539	0,7031	0,6785

Tabela A.4. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 0,94% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,9229	0,4637	0,6933
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3368	1,3069	1,3219
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,0108	0,6817	0,8462
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3551	1,3743	1,3647
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,2962	0,2456	0,2709
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4052	1,3993	1,4022
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3249	1,2395	1,2822
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,1997	1,1547	1,1772
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6858	0,7095	0,6977
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,9916	1,0339	1,0127
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,9799	0,7095	0,8447
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	1,0189	0,9352	0,9771
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,0493	1,0761	1,0627
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,1132	1,1105	1,1119
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3013	1,3238	1,3126
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,3085	1,2170	1,2628
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,5882	0,6453	0,6168
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,6556	0,6327	0,6442
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3492	1,3510	1,3501
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,4581	0,3325	0,3953
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,2271	0,2248	0,2259
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,1690	1,2836	1,2263
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3140	1,3498	1,3319
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2332	1,2290	1,2311
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,2943	1,2980	1,2962
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2194	1,3063	1,2628
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,7356	0,7015	0,7185
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,7684	0,7473	0,7578
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,7926	0,7268	0,7597
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,7456	0,6828	0,7142
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,1579	1,1893	1,1736
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3787	1,4016	1,3901
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,0607	1,2246	1,1426
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,0003	1,0334	1,0169
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2188	1,2295	1,2242
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3979	1,4154	1,4066
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3102	1,2794	1,2948
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3966	1,3394	1,3680
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,4385	1,4051	1,4218
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,7022	0,6895	0,6958
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,6343	0,6831	0,6587

Tabela A.5. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 1,88% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,4620	0,6438	0,5529
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,2814	1,2749	1,2782
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,4849	0,4748	0,4798
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3072	1,2880	1,2976
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,3022	0,3034	0,3028
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3530	1,3488	1,3509
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3105	1,3088	1,3096
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,1338	1,0374	1,0856
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,7771	0,6449	0,7110
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,1000	1,0596	1,0798
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,6840	0,7240	0,7040
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,9485	1,0119	0,9802
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,9723	1,0878	1,0300
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,0073	1,0878	1,0476
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3041	1,2814	1,2928
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,0691	1,2348	1,1520
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,8403	0,7709	0,8056
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,7772	0,6534	0,7153
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3459	1,2633	1,3046
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,4600	0,2569	0,3584
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,2780	0,2285	0,2532
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,9767	1,0442	1,0105
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3308	1,3671	1,3490
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,1607	1,1854	1,1731
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3208	1,2438	1,2823
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,1881	1,2631	1,2256
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,6962	0,6947	0,6954
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,8265	0,7249	0,7757
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,8215	0,7543	0,7879
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,7089	0,6828	0,6958
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,1041	1,1690	1,1366
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3682	1,3384	1,3533
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,1463	1,1094	1,1278
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,9332	0,9400	0,9366
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2220	1,2245	1,2233
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3471	1,3508	1,3489
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,2252	1,1696	1,1974
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,2736	1,3292	1,3014
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,3767	1,3603	1,3685
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6877	0,7172	0,7024
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5743	0,6934	0,6338

Tabela A.6. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 3,75% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,3526	0,2181	0,2853
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,0344	1,0185	1,0265
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,3299	0,4272	0,3785
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,1781	1,1060	1,1421
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,2942	0,3227	0,3084
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,2718	1,2468	1,2593
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,1757	1,2562	1,2159
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0659	0,0312	0,0486
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6196	0,5825	0,6011
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,4623	0,3478	0,4050
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,8213	0,7365	0,7789
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7113	0,6118	0,6616
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,4297	0,4264	0,4280
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	0,0637	0,1652	0,1145
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,1964	1,0830	1,1397
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,8823	0,9491	0,9157
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,7374	0,6911	0,7143
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,5902	0,5154	0,5528
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,2852	1,2552	1,2702
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,2538	0,2327	0,2432
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,2689	0,2704	0,2696
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,9393	1,0401	0,9897
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,2435	1,2761	1,2598
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	0,9932	0,9762	0,9847
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,1160	1,0457	1,0809
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,0945	1,0607	1,0776
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,5544	0,5979	0,5761
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,5090	0,5227	0,5158
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,6697	0,6403	0,6550
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,5445	0,5281	0,5363
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	0,8716	0,7975	0,8346
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,2634	1,2449	1,2541
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	0,9095	0,9701	0,9398
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,5721	0,3827	0,4774
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,0547	1,0520	1,0534
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,1631	1,1442	1,1536
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,0444	1,0222	1,0333
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,2493	1,1810	1,2152
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,2498	1,1755	1,2126
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6705	0,7311	0,7008
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5626	0,6012	0,5819

Tabela A.7. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 7,50% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0014	0,0004	0,0009
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	-0,0094	0,0485	0,0196
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0035	-0,0005	0,0015
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,1069	0,3229	0,2149
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,1683	0,1669	0,1676
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,1878	0,3275	0,2576
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,3217	0,3704	0,3460
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	-0,0100	0,0035	-0,0033
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,1253	0,0883	0,1068
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	-0,0008	-0,0011	-0,0010
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0644	0,1079	0,0862
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	-0,0034	-0,0087	-0,0061
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,0341	0,0249	0,0295
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,0120	-0,0105	-0,0113
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	-0,0036	0,0116	0,0040
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	-0,0073	-0,0118	-0,0096
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,0045	0,0101	0,0073
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,0819	0,0882	0,0851
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	0,4638	0,3633	0,4135
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,1253	0,1120	0,1186
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,0934	0,1324	0,1129
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,0054	0,0145	0,0046
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	0,3840	0,2208	0,3024
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,0106	-0,0091	-0,0098
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,0037	-0,0108	-0,0072
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	0,0546	0,1146	0,0846
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,1601	0,1339	0,1470
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,0067	0,0041	0,0054
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,1217	0,0770	0,0993
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,1563	0,0694	0,1128
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	-0,0149	-0,0118	-0,0133
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	0,0236	0,0744	0,0490
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	0,0355	0,0865	0,0610
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	-0,0144	-0,0124	-0,0134
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	0,0476	0,0166	0,0321
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	0,0043	0,0039	0,0041
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	-0,0052	-0,0044	-0,0048
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	0,1294	0,0922	0,1108
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0018	0,0160	0,0071
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,0710	0,1531	0,1120
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,1490	0,0591	0,1040

Tabela A.8. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 15,0% de NaCl.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0224	0,0227	0,0225
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	0,0211	0,0069	0,0140
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0227	0,0220	0,0223
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,0058	0,0065	0,0062
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,0236	0,0218	0,0227
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,0211	0,0217	0,0214
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,0252	0,0232	0,0242
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0064	0,0112	0,0088
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,0119	0,0116	0,0118
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,0253	0,0279	0,0266
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0052	0,0079	0,0066
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,0101	0,0083	0,0092
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,0260	0,0233	0,0246
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	0,0070	0,0071	0,0071
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	0,0083	0,0076	0,0080
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,0100	0,0078	0,0089
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,0056	0,0075	0,0066
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,0051	0,0062	0,0057
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	0,0249	0,0308	0,0278
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,0296	0,0253	0,0274
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,0206	0,0211	0,0208
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,0070	0,0079	0,0075
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	0,0051	0,0076	0,0064
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	0,0088	0,0089	0,0089
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	0,0062	0,0067	0,0065
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	0,0232	0,0243	0,0237
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,0228	0,0223	0,0225
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,0220	0,0204	0,0212
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,0201	0,0198	0,0199
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,0225	0,0247	0,0236
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	0,0058	0,0084	0,0071
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	0,0216	0,0269	0,0242
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	0,0212	0,0238	0,0225
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,0036	0,0039	0,0038
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	0,0089	0,0055	0,0072
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	0,0198	0,0233	0,0215
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	0,0063	0,0041	0,0052
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	0,0175	0,0063	0,0119
<i>L. agilis</i>	Lac 39	0,0201	0,0294	0,0247
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,0160	0,0221	0,0190
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,0112	0,0283	0,0197

APENDÊNCIA B. AVALIAÇÃO COM CONCENTRAÇÕES DE SAIS BILIARES

Nas tabelas a seguir estão os valores de absorvância obtidas de experimentos com a adição de sais biliares variando de 0 a 10%. Tais ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela B.1. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h controle.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	1,1185	0,4039	0,7612
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3418	1,3409	1,3414
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,3236	1,3008	1,3122
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3493	1,3399	1,3446
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6737	0,6629	0,6683
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3220	1,3195	1,3208
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,1662	1,2392	1,2027
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,0491	1,0167	1,0329
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	1,0555	1,0998	1,0777
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,0686	1,0842	1,0764
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	1,1255	1,0878	1,1067
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	1,0740	1,0933	1,0837
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,1281	1,1225	1,1253
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,3340	1,3273	1,3307
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3531	1,3586	1,3559
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,1197	1,1143	1,1170
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,6008	0,6231	0,6120
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,5859	0,5997	0,5928
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3452	1,3340	1,3396
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,9046	0,9120	0,9083
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,9804	0,9815	0,9809
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,1767	1,1721	1,1744
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,2119	1,3040	1,2579
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2727	1,1810	1,2268
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3208	1,3145	1,3176
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,1992	1,1802	1,1897
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,5504	0,5116	0,5310
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,6498	0,5922	0,6210
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,7788	0,7090	0,7439
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,6547	0,6931	0,6739
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,3282	1,3322	1,3302
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3363	1,3394	1,3379
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,3758	1,3545	1,3652
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,3190	1,3259	1,3225
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3757	1,3411	1,3584
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3384	1,3464	1,3424
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3414	1,3413	1,3414
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3292	1,3354	1,3323
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,2680	1,3169	1,2925
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,5654	0,6716	0,6185
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,4925	0,4070	0,4497

Tabela B.2. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h 0,16% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,1142	-0,0082	0,0530
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3185	1,3365	1,3275
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,7788	0,0035	0,3912
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3268	1,3648	1,3458
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6660	0,6658	0,6659
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3701	1,3625	1,3663
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3701	1,3081	1,3391
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	1,0493	0,9373	0,9933
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6444	0,6767	0,6606
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,9812	1,0686	1,0249
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,6624	0,5922	0,6273
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,8837	0,9499	0,9168
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,7066	0,6540	0,6803
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,2538	1,2650	1,2594
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3448	1,3436	1,3442
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,0407	0,7592	0,9000
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,7436	0,7907	0,7672
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,7335	0,7591	0,7463
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3398	1,3530	1,3464
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,7188	0,7506	0,7347
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,3689	0,4184	0,3936
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,0430	1,2638	1,1534
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3261	1,3680	1,3470
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2457	1,2737	1,2597
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3141	1,3165	1,3153
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2902	1,3090	1,2996
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,6603	0,6935	0,6769
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,5755	0,5841	0,5798
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,6796	0,7936	0,7366
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,5871	0,6207	0,6039
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,3182	1,3560	1,3371
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3406	1,3174	1,3290
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,3473	1,3290	1,3382
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,2673	1,3293	1,2983
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3182	1,3136	1,3159
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3199	1,3333	1,3266
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3502	1,3475	1,3489
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3436	1,3512	1,3474
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,2168	1,2952	1,2560
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,6867	0,8995	0,7931
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5879	0,6227	0,6053

Tabela B.3. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h 0,31% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0052	-0,0307	-0,0127
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,2854	1,3986	1,3420
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,5768	0,1009	0,3389
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3653	1,3857	1,3755
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6545	0,6855	0,6700
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,3236	1,4224	1,3730
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3017	1,3316	1,3167
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,6964	0,6743	0,6854
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6891	0,8215	0,7553
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,9163	0,8393	0,8778
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,4115	0,3982	0,4049
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,9040	0,7466	0,8253
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,8624	0,7983	0,8304
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,3791	1,3513	1,3652
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3654	1,3522	1,3588
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,9255	0,9385	0,9320
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,8297	0,8483	0,8390
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,8260	0,8353	0,8307
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3616	1,3895	1,3756
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,7838	0,7783	0,7811
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,5701	0,5901	0,5801
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,0350	1,2607	1,1478
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3067	1,3222	1,3144
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,3330	1,3499	1,3414
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,2760	1,3098	1,2929
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,3175	1,3295	1,3235
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,8442	0,8837	0,8639
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,6879	0,8145	0,7512
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,7495	0,9011	0,8253
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,6914	0,7959	0,7436
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,3436	1,3841	1,3639
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3978	1,3635	1,3807
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,3424	1,3463	1,3444
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,3703	1,3649	1,3676
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3759	1,3714	1,3737
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,4070	1,3606	1,3838
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3607	1,3929	1,3768
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3277	1,3415	1,3346
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,0607	1,1986	1,1297
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,9044	0,9100	0,9072
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5990	0,5384	0,5687

Tabela B.4. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 0,62% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	-0,0256	-0,0291	-0,0273
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,4441	1,4404	1,4423
<i>L. casei</i>	Lac 03	-0,0275	-0,0305	-0,0290
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,4633	1,5014	1,4824
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6381	0,6565	0,6473
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4397	1,4497	1,4447
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,4403	1,4159	1,4281
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,4361	0,5033	0,4697
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,9680	1,0106	0,9893
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	1,0609	1,0386	1,0498
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,3718	1,1642	0,7680
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7478	0,7010	0,7244
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,0534	1,1172	1,0853
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,4353	1,3796	1,4075
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,4947	1,4511	1,4729
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,5961	0,6866	0,6414
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	1,0751	1,0862	1,0807
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	1,1139	1,1116	1,1128
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,4887	1,4735	1,4811
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,8472	0,8115	0,8294
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,5415	0,5969	0,5692
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,9686	1,3444	1,1565
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,4251	1,4432	1,4341
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,3998	1,4525	1,4261
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,3332	1,4051	1,3691
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,4572	1,4596	1,4584
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	1,0631	1,0593	1,0612
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,9415	1,0215	0,9815
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	1,2115	1,2187	1,2151
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	1,1376	1,1240	1,1308
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,3718	1,4099	1,3909
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4680	1,4420	1,4550
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,4469	1,4888	1,4679
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,4369	1,4421	1,4395
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,4417	1,4195	1,4306
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,4155	1,4695	1,4425
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,4183	1,5033	1,4608
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4118	1,4094	1,4106
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,0675	1,4270	1,2473
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	1,0679	1,1015	1,0847
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5044	0,5663	0,5353

Tabela B.5. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 1,25% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	-0,0250	-0,0238	-0,0244
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,4811	1,4759	1,4785
<i>L. casei</i>	Lac 03	-0,0198	-0,0121	-0,0159
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,6030	1,4937	1,5484
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,5651	0,5439	0,5545
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4848	1,5199	1,5024
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,4427	1,4046	1,4237
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,4034	0,4048	0,4041
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,8517	0,8489	0,8503
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,8544	0,5760	0,7152
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0659	0,2416	0,1538
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7036	0,6702	0,6869
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,2529	1,1946	1,2238
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,4356	1,3406	1,3881
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,5144	1,4819	1,4982
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,8669	0,6468	0,7569
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	1,1448	1,1567	1,1508
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	1,2294	1,2217	1,2256
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,5285	1,5079	1,5182
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,8615	0,7999	0,8307
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,4503	0,4626	0,4564
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,7422	1,1749	0,9585
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,4655	1,5165	1,4910
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,4787	1,4376	1,4581
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,4352	1,5346	1,4849
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,4570	1,4655	1,4612
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	1,2045	1,2305	1,2175
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	1,1437	1,1016	1,1226
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	1,3364	1,2818	1,3091
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	1,2340	1,2067	1,2203
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,4966	1,5283	1,5125
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4747	1,5167	1,4957
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,4927	1,4754	1,4841
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,4921	1,4793	1,4857
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,4627	1,4941	1,4784
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,5164	1,5003	1,5084
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,4705	1,5289	1,4997
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4988	1,4959	1,4974
<i>L. agilis</i>	Lac 39	0,0544	1,3538	0,7041
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	1,0755	1,1636	1,1196
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,4992	0,5000	0,4996

Tabela B.6. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 2,50% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	-0,0250	-0,0238	-0,0244
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,4811	1,4759	1,4785
<i>L. casei</i>	Lac 03	-0,0198	-0,0121	-0,0159
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,6030	1,4937	1,5484
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,5651	0,5439	0,5545
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4848	1,5199	1,5024
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,4427	1,4046	1,4237
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,4034	0,4048	0,4041
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,8517	0,8489	0,8503
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,8544	0,5760	0,7152
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0659	0,2416	0,1538
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7036	0,6702	0,6869
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	1,2529	1,1946	1,2238
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,4356	1,3406	1,3881
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,5144	1,4819	1,4982
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,8669	0,6468	0,7569
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	1,1448	1,1567	1,1508
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	1,2294	1,2217	1,2256
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,5285	1,5079	1,5182
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,8615	0,7999	0,8307
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,4503	0,4626	0,4564
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,7422	1,1749	0,9585
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,4655	1,5165	1,4910
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,4787	1,4376	1,4581
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,4352	1,5346	1,4849
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,4570	1,4655	1,4612
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	1,2045	1,2305	1,2175
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	1,1437	1,1016	1,1226
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	1,3364	1,2818	1,3091
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	1,2340	1,2067	1,2203
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,4966	1,5283	1,5125
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4747	1,5167	1,4957
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,4927	1,4754	1,4841
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,4921	1,4793	1,4857
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,4627	1,4941	1,4784
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,5164	1,5003	1,5084
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,4705	1,5289	1,4997
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4988	1,4959	1,4974
<i>L. agilis</i>	Lac 39	0,0544	1,3538	0,7041
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	1,0755	1,1636	1,1196
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,4992	0,5000	0,4996

Tabela B.7. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 5,0% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0099	1,3770	0,6935
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3942	1,3794	1,3868
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0075	1,0973	0,5524
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,4065	1,4161	1,4113
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6293	0,6314	0,6304
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,4182	1,4212	1,4197
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,3529	1,3094	1,3312
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0489	0,0243	0,0366
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,7443	0,7597	0,7520
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,5747	0,4695	0,5221
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0024	0,0137	0,0081
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7586	0,6410	0,6998
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,7994	0,6965	0,7480
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,3469	1,2886	1,3178
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,4107	1,4314	1,4211
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,2442	0,5006	0,3724
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,5050	0,6172	0,5611
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,6693	0,8428	0,7561
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3940	1,3870	1,3905
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,9191	0,9101	0,9146
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,5474	0,5613	0,5543
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,4328	1,4860	1,4594
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,4126	1,4121	1,4123
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,4263	1,4484	1,4373
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,4123	1,4037	1,4080
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,3498	1,3930	1,3714
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,8482	0,8829	0,8655
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,8646	0,8973	0,8809
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,9772	1,0905	1,0338
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,8417	0,8066	0,8241
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,4425	1,4263	1,4344
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4146	1,4199	1,4173
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,4037	1,3988	1,4013
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,3912	1,4252	1,4082
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3379	1,4005	1,3692
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,4279	1,4225	1,4252
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,4063	1,3718	1,3891
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4381	1,4286	1,4334
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,1699	1,0344	1,1022
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,7540	0,9014	0,8277
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5787	0,6346	0,6067

Tabela B.8. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h com 10,0% de sais biliares.

Espécies	Código	DO ₆₀₀		Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0705	0,0831	0,0768
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,2843	1,2973	1,2908
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0689	0,0790	0,0740
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,3086	1,3388	1,3237
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,6403	0,7246	0,6825
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,2085	1,3062	1,2574
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,2970	1,2367	1,2669
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0682	0,0945	0,0814
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,7814	0,7369	0,7592
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,2857	0,0913	0,1885
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0615	0,1700	0,1158
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,3811	0,5792	0,4802
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,6934	0,5895	0,6415
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,1298	1,1333	1,1316
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3200	1,3360	1,3280
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,0631	0,0844	0,5738
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,4792	0,4517	0,4655
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,5698	0,5082	0,5390
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,3512	1,3541	1,3527
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,8735	0,5071	0,6903
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,6641	0,7186	0,6913
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,2554	1,0205	1,1379
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,3320	1,3679	1,3499
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,3408	1,3039	1,3223
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,2855	1,2715	1,2785
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2028	1,2251	1,2139
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,8459	0,6346	0,7402
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,8859	0,5219	0,7039
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,8783	0,8962	0,8872
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,8225	0,7722	0,7973
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,3182	1,3533	1,3358
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3166	1,3214	1,3190
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,2764	1,3174	1,2969
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,2945	1,3135	1,3040
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3046	1,3086	1,3066
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3493	1,3719	1,3606
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3004	1,3538	1,3271
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3361	1,3751	1,3556
<i>L. agilis</i>	Lac 39	0,1003	0,6716	0,3860
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,8641	0,7122	0,7882
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,6245	0,7377	0,6811

APÊNDICE C. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA

Nas tabelas abaixo estão representados as leituras de absorbâncias obtidas em condições de temperatura de 15°C, 37°C e 45°C. Tais ensaios foram realizados em quadruplicata e suas médias foram calculadas.

Tabela C.1. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, e em atmosfera de 5% de CO₂ à 15°C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0040	-0,0137	0,0072	-0,0129	-0,0065
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	0,0061	-0,0126	0,0070	-0,0128	-0,0031
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0110	-0,0139	0,0055	-0,0117	-0,0023
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,0110	-0,0065	0,0072	-0,0149	-0,0008
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,0244	0,0146	0,0186	0,0008	0,0146
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,0236	0,0053	0,0089	-0,0074	0,0076
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,0309	0,0236	0,0132	-0,0058	0,0155
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0059	-0,0148	0,0032	-0,0168	-0,0056
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,0158	0,0023	0,0143	-0,0071	0,0063
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,0057	-0,0173	0,0036	-0,0174	-0,0063
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	-0,0154	-0,0162	-0,0138	-0,0141	-0,0148
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	-0,0139	-0,0135	-0,0139	-0,0157	-0,0142
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	-0,0093	-0,0077	-0,0120	-0,0130	-0,0105
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,0154	-0,0160	-0,0145	-0,0160	-0,0154
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	-0,0143	-0,0025	-0,0082	-0,0094	-0,0086
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	-0,0135	-0,0154	-0,0142	-0,0165	-0,0149
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	-0,0061	-0,0081	-0,0101	-0,0102	-0,0086
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,0025	-0,0034	-0,0102	-0,0059	-0,0042
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	-0,0091	0,0203	0,0074	0,0091	0,0069
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	-0,0246	-0,0265	0,0031	-0,0033	-0,0128
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,0142	0,0613	0,0147	0,0230	0,0283
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,0149	-0,0161	-0,0160	-0,0168	-0,0159
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	-0,0149	-0,0128	-0,0067	-0,0127	-0,0117
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,0122	-0,0109	-0,0102	-0,0108	-0,0110
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,0171	-0,0150	-0,0104	-0,0167	-0,0148
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	-0,0110	-0,0015	-0,0115	-0,0041	-0,0070
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,0530	0,1091	0,0281	0,0590	0,0623
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,0332	0,0220	0,0257	0,1339	0,0537
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	-0,0105	-0,0030	0,0275	0,0240	0,0095
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	-0,0058	0,0567	0,0219	0,0930	0,0414
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	-0,0140	0,0203	0,0430	0,0218	0,0178
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	-0,0013	0,0181	0,0301	0,0434	0,0226
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	-0,0011	0,0321	0,0335	0,1177	0,0455
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,0956	0,1285	0,0424	0,1328	0,0998
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	-0,0019	-0,0068	-0,0106	0,0212	0,0005
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	0,0054	0,0183	0,0013	0,0097	0,0087
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	0,0120	0,0006	0,0184	0,0723	0,0258
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	-0,0039	0,0078	0,0056	0,0227	0,0080
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0150	-0,0157	-0,0158	-0,0173	-0,0159
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,5080	0,5751	0,3025	0,3379	0,4309
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	-0,0071	0,0056	0,0053	0,0103	0,0035

Tabela C.2. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,4068	0,0217	0,7705	0,3827	0,3954
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3207	1,0699	1,3020	1,3216	1,2535
<i>L. casei</i>	Lac 03	1,3111	0,3581	0,7873	1,5107	0,9918
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,2799	1,2008	1,2888	1,3321	1,2754
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,5766	0,5066	0,4628	0,3229	0,4672
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,0808	1,1448	1,2499	1,2626	1,1845
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,9834	0,8598	1,1471	1,0210	1,0028
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,5945	1,0039	0,9701	0,9338	0,8756
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,7780	0,6004	1,0370	1,0132	0,8571
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,4608	0,9994	0,9808	0,9335	0,8436
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,8537	0,6715	0,9269	0,9128	0,8412
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,9579	0,9092	1,0015	0,9812	0,9624
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,9263	0,8803	1,0147	1,0158	0,9593
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,1654	0,5824	0,6449	1,2204	0,9033
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,3299	1,1681	1,2818	1,2802	1,2650
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	1,1370	1,0735	0,9858	0,9586	1,0387
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,6847	0,3212	0,2997	0,4061	0,4279
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,3541	0,2328	0,2196	0,3961	0,3006
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,2014	1,2308	1,2960	1,2794	1,2519
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,8807	0,5701	0,5411	0,5044	0,6241
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,7403	0,3425	0,7005	0,7228	0,6265
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,4173	1,0297	0,9337	0,8197	1,0501
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,1600	1,0209	1,2026	1,2984	1,1705
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,0624	0,9496	1,3608	1,2383	1,1528
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,1718	1,0329	1,2367	1,2399	1,1703
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,0482	1,1741	1,1332	1,1700	1,1314
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,8374	0,6200	0,4153	0,5691	0,6104
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,8065	0,6696	0,6992	0,4938	0,6673
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,8459	0,7280	0,6053	0,6699	0,7123
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,7677	0,3598	0,7409	0,5666	0,6087
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2269	1,2044	1,2961	1,2729	1,2501
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,1860	1,2012	1,2685	1,3456	1,2503
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,1060	1,0210	1,1783	1,0561	1,0903
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,2620	1,1964	1,2661	1,1420	1,2166
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,2222	1,4404	1,2701	1,2177	1,2876
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,2555	1,2585	1,2730	1,3040	1,2727
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,3163	1,3185	1,3505	1,3334	1,3297
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,3047	1,2964	1,3240	1,3429	1,3170
<i>L. agilis</i>	Lac 39	1,0711	0,9629	1,2650	0,9982	1,0743
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,5284	0,6896	0,5160	0,5102	0,5610
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,7523	0,7951	0,5742	0,4937	0,6538

Tabela C.1. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em atmosfera de 5% de CO₂ à 45° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0043	-0,0137	0,0051	-0,0095	-0,0035
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	0,0042	-0,0141	0,0025	-0,0154	-0,0057
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0025	-0,0152	0,0039	-0,0124	-0,0053
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,0024	-0,0164	0,0049	-0,0103	-0,0049
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,4398	0,2998	0,0500	0,0833	0,2182
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,0731	-0,0159	0,0325	-0,0039	0,0215
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,0041	-0,0174	0,0052	-0,0131	-0,0053
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,1462	0,1957	0,4733	0,2240	0,2598
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,3806	0,4203	0,2441	0,2208	0,3165
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,4167	0,5539	0,2814	0,2110	0,3658
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,0184	0,0575	0,0296	0,0251	0,0327
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,1229	0,8059	0,0445	0,0270	0,2501
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,4336	0,4975	0,3339	0,4676	0,4332
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,0147	-0,0179	-0,0150	-0,0165	-0,0160
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	0,6748	0,7677	0,0060	-0,0080	0,3601
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,7741	0,6751	-0,0059	-0,0053	0,3595
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,2266	0,3322	0,2287	0,0805	0,2170
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,2303	0,4963	0,1312	0,1634	0,2553
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	-0,0249	-0,0269	-0,0137	-0,0171	-0,0207
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,1264	0,1029	0,2674	0,2090	0,1764
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,4623	0,2589	0,2275	0,2329	0,2954
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,0100	-0,0128	-0,0143	-0,0172	-0,0136
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	0,1773	-0,0131	-0,0163	0,2518	0,0999
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,0152	-0,0146	-0,0128	-0,0135	-0,0140
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,0162	-0,0135	-0,0157	-0,0154	-0,0152
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	-0,0174	-0,0184	-0,0124	-0,0133	-0,0154
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,2701	0,2715	0,2810	0,3572	0,2950
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,3291	0,4328	0,1399	0,1180	0,2550
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,2077	0,2694	0,2134	0,1924	0,2207
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,2537	0,2357	0,2335	0,2522	0,2438
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	-0,0178	-0,0208	-0,0155	-0,0219	-0,0190
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	-0,0170	-0,0206	-0,0159	-0,0188	-0,0181
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	-0,0168	-0,0200	-0,0179	-0,0212	-0,0190
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	-0,0158	-0,0165	-0,0276	-0,0330	-0,0232
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	-0,0148	-0,0184	-0,0101	-0,0167	-0,0150
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	-0,0173	-0,0194	-0,0140	-0,0195	-0,0176
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	-0,0155	0,0478	0,1415	0,0002	0,0435
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	0,1390	-0,0141	0,2601	-0,0119	0,0933
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0149	-0,0186	-0,0086	-0,0093	-0,0129
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,4398	0,5164	0,2341	0,2775	0,3670
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,2813	0,1883	0,2257	0,2588	0,2385

APÊNDICE D. AVALIAÇÃO DE pH

Nas tabelas abaixo estão representados as leituras de absorvâncias obtidas em condições de pH de 3, 5, 6 e 7. Tais ensaios foram realizados em quadruplicata e suas médias foram calculadas

Tabela D.1. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em pH 3 e em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0092	-0,0065	0,0103	-0,0048	0,0020
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	0,0098	-0,0072	0,0074	0,0031	0,0033
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0072	-0,0066	0,0077	-0,0007	0,0019
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,0090	-0,0038	0,0117	-0,0027	0,0035
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,0074	-0,0034	0,0089	-0,0028	0,0025
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	0,0078	0,0038	0,0048	-0,0052	0,0028
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,0079	-0,0041	0,0111	0,0013	0,0040
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,0115	-0,0072	0,0116	-0,0035	0,0031
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,0056	-0,0046	0,0161	-0,0073	0,0024
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,0170	0,0012	0,0154	-0,0082	0,0063
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	-0,0103	-0,0137	0,0009	0,0015	-0,0054
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,0001	-0,0090	0,0031	-0,0011	-0,0017
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,0045	-0,0111	-0,0008	0,0006	-0,0017
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	-0,0071	-0,0085	0,0023	-0,0044	-0,0044
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	0,0023	-0,0082	0,0057	-0,0010	-0,0003
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	-0,0087	-0,0108	-0,0013	-0,0066	-0,0069
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,0040	-0,0059	-0,0025	-0,0080	-0,0031
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	-0,0041	-0,0064	0,0040	-0,0094	-0,0040
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	-0,0011	-0,0063	0,0082	-0,0095	-0,0022
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,0102	-0,0010	0,0017	-0,0104	0,0001
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	-0,0130	-0,0115	0,0045	0,0051	-0,0037
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	-0,0082	-0,0126	0,0044	0,0091	-0,0018
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	-0,0063	-0,0005	0,0079	-0,0081	-0,0018
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	-0,0021	-0,0016	0,0057	-0,0046	-0,0007
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	-0,0005	-0,0080	-0,0106	-0,0052	-0,0061
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	-0,0040	-0,0040	-0,0041	0,0117	-0,0001
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	-0,0047	-0,0001	-0,0017	-0,0056	-0,0030
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	-0,0081	-0,0005	0,0019	-0,0095	-0,0041
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	-0,0041	0,0015	-0,0041	-0,0042	-0,0027
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,0035	0,0003	-0,0011	0,0025	0,0013
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	-0,0195	-0,0056	-0,0027	-0,0192	-0,0118
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	-0,0115	-0,0213	0,0114	-0,0117	-0,0083
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	-0,0155	0,0016	-0,0006	-0,0092	-0,0059
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	-0,0116	-0,0180	-0,0050	-0,0133	-0,0120
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	-0,0091	-0,0196	-0,0016	-0,0080	-0,0096
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	-0,0071	-0,0198	-0,0021	-0,0161	-0,0113
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	-0,0118	-0,0120	-0,0113	-0,0095	-0,0112
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	-0,0104	-0,0232	0,0073	-0,0108	-0,0093
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0065	-0,0124	-0,0010	-0,0178	-0,0094
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	-0,0125	-0,0222	-0,0043	-0,0202	-0,0148
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	-0,0029	-0,0028	-0,0011	-0,0076	-0,0036

Tabela D.2. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em pH 5 e em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0224	-0,0159	0,5303	-0,0146	0,1305
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,0565	1,0828	0,9758	1,0058	1,0302
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,0078	0,0118	0,0731	-0,0042	0,0221
<i>L. casei</i>	Lac 04	0,9783	1,1495	1,0228	1,1380	1,0721
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,0106	0,1769	0,0068	-0,0100	0,0461
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,0855	1,0213	1,1876	1,2403	1,1336
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,0586	1,0471	1,0036	1,0943	1,0509
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,4802	0,4966	0,7114	0,8283	0,6291
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,5067	0,4425	1,0441	1,0848	0,7695
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,4024	0,3676	0,7572	0,7992	0,5816
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,4091	0,5440	0,7467	0,7446	0,6111
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,5159	0,7244	0,8459	0,7089	0,6987
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,3740	0,5548	0,7947	1,0763	0,6999
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	0,0849	0,4122	0,2707	0,3101	0,2694
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	0,6580	1,0684	1,2102	1,1864	1,0307
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,3020	0,4094	0,7386	0,7454	0,5488
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,0115	0,1288	0,0172	0,0206	0,0445
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,6651	0,3996	0,9019	-0,0074	0,4898
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	0,8170	0,8571	1,2883	1,2796	1,0605
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	-0,0059	0,4751	0,9943	1,1503	0,6534
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,7070	1,0392	0,8471	0,8697	0,8657
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,9737	1,2875	0,5677	0,4955	0,8311
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,0243	1,0870	1,1938	1,0206	1,0814
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2684	1,0071	1,2692	1,0915	1,1590
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	0,8526	1,1789	1,1455	1,2143	1,0978
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2078	1,1714	1,0973	1,0156	1,1230
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,3421	-0,0090	0,1416	0,4319	0,2266
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,0290	0,0277	0,8686	0,0267	0,2380
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,0218	0,0213	1,0440	0,0235	0,2776
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	-0,0051	-0,0020	0,0058	0,0015	0,0000
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2406	1,3269	1,1406	1,0702	1,1945
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,2262	1,3638	1,1782	1,0924	1,2151
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,2311	0,9334	1,1761	0,5774	0,9795
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,2010	0,8516	1,2090	0,6209	0,9706
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3080	1,0423	1,2498	0,6932	1,0733
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,2337	1,3005	1,1901	1,1197	1,2110
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,0617	1,3198	1,2281	1,1455	1,1887
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	0,8382	1,1143	1,2162	1,1456	1,0785
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0084	-0,0091	-0,0167	-0,0140	-0,0120
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,0034	-0,0042	0,0012	-0,0076	-0,0018
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,0060	-0,0042	0,0101	-0,0077	0,0010

Tabela D.3. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em pH 6 e em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,0413	0,1129	-0,0021	-0,0034	0,0371
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,2525	1,2757	1,2020	1,2623	1,2481
<i>L. casei</i>	Lac 03	-0,0043	0,0959	0,0590	1,0072	0,2894
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,2810	1,2655	1,1559	1,2147	1,2292
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,2600	0,2610	0,7703	0,0995	0,3477
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,2141	1,2151	1,1388	1,1725	1,1851
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	1,1727	1,2144	1,1175	1,0251	1,1324
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,7296	0,6997	0,7443	0,8097	0,7458
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	1,0204	0,9792	0,8612	0,8791	0,9349
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,9082	0,8891	0,7069	0,7668	0,8177
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,8041	0,7847	0,7953	0,8142	0,7995
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,7691	0,7840	0,8107	0,7713	0,7837
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,8459	0,8529	0,6908	0,7773	0,7917
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	0,9045	1,3150	0,4358	1,1246	0,9449
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,2163	1,2728	1,2027	1,1672	1,2147
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,8109	0,7778	0,7684	0,6993	0,7641
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,2814	0,1998	0,1340	0,2837	0,2247
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,2443	0,2854	0,0922	0,0437	0,1664
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,2401	1,2261	1,1279	1,1910	1,1962
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,1337	0,1199	-0,0632	-0,0655	0,0312
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,8253	0,8397	0,7896	0,8320	0,8216
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	1,2065	1,2341	1,2140	1,1845	1,2097
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,2308	1,2014	0,9242	0,9979	1,0885
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	1,2896	1,3006	1,2014	1,2152	1,2517
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,2361	1,3292	1,1869	1,2148	1,2417
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,2512	1,1700	0,9967	1,1029	1,1302
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,1420	0,1631	0,0739	0,0432	0,1055
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,1668	0,2489	0,1477	0,1574	0,1802
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,1103	0,1379	-0,0619	-0,0328	0,0383
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,1439	0,1268	-0,0282	0,0180	0,0651
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,2852	1,3009	1,2030	1,1578	1,2367
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,3228	1,3181	1,2231	1,2007	1,2661
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,3024	1,1919	1,2598	0,9365	1,1726
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	1,2607	1,0153	1,1585	0,7399	1,0436
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,3464	1,3046	1,2342	1,1572	1,2606
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3326	1,3215	1,2494	1,2596	1,2907
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,2879	1,2326	1,2478	1,2729	1,2603
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,2762	1,2903	1,2115	1,2316	1,2524
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0205	0,0500	1,1162	-0,0941	0,2629
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,0510	0,1064	-0,0276	0,0046	0,0336
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,5749	0,3487	0,4049	0,4898	0,4545

Tabela D.4. Crescimento de *Lactobacillus* em caldo MRS, em pH 7 e em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C por 24 h.

Espécies	Código	DO ₆₀₀				Média
<i>L. fermentum</i>	Lac 01	0,1263	0,2552	0,0614	-0,0063	0,1092
<i>L. plantarum</i>	Lac 02	1,3314	1,3538	1,3000	1,2972	1,3206
<i>L. casei</i>	Lac 03	0,1955	-0,0192	1,0261	0,0403	0,3107
<i>L. casei</i>	Lac 04	1,2583	1,3327	1,2724	1,2915	1,2888
<i>L. plantarum</i>	Lac 05	0,1447	0,1698	0,5494	0,3412	0,3013
<i>L. plantarum</i>	Lac 06	1,0180	1,0962	1,2881	1,2441	1,1616
<i>L. fermentum</i>	Lac 07	0,9985	1,0137	1,2968	1,0868	1,0990
<i>L. fermentum</i>	Lac 08	0,7523	0,8317	0,9701	0,9428	0,8743
<i>L. fermentum</i>	Lac 09	0,6795	0,8819	1,0500	1,1740	0,9464
<i>L. plantarum</i>	Lac 10	0,6763	0,8331	1,0254	1,0159	0,8877
<i>L. plantarum</i>	Lac 11	0,7803	0,8266	0,9047	0,8473	0,8398
<i>L. fermentum</i>	Lac 12	0,8176	0,8674	0,9437	0,8953	0,8810
<i>L. fermentum</i>	Lac 13	0,9034	0,8654	0,9198	0,9024	0,8978
<i>L. fermentum</i>	Lac 14	1,1722	0,4355	0,0961	0,8304	0,6336
<i>L. plantarum</i>	Lac 15	1,0518	1,3443	1,3046	1,3291	1,2575
<i>L. plantarum</i>	Lac 16	0,6463	1,0435	0,9490	0,9228	0,8904
<i>L. plantarum</i>	Lac 17	0,4752	0,4319	0,4860	0,4545	0,4619
<i>L. plantarum</i>	Lac 18	0,2202	0,3492	0,5158	0,4061	0,3729
<i>L. plantarum</i>	Lac 19	1,1019	1,1938	1,3208	1,3375	1,2385
<i>L. plantarum</i>	Lac 20	0,3293	0,3674	0,5408	0,4995	0,4343
<i>L. plantarum</i>	Lac 21	0,6164	0,5129	0,5048	0,5783	0,5531
<i>L. fermentum</i>	Lac 22	0,6666	0,7552	1,1045	0,5417	0,7670
<i>L. plantarum</i>	Lac 23	1,1550	1,1768	1,1330	1,0961	1,1403
<i>L. plantarum</i>	Lac 24	0,9467	1,3412	1,2024	1,2996	1,1975
<i>L. plantarum</i>	Lac 25	1,2571	1,3647	1,2506	1,2677	1,2851
<i>L. fermentum</i>	Lac 26	1,0413	0,9920	1,0168	0,8851	0,9838
<i>L. plantarum</i>	Lac 27	0,3281	0,2950	0,3601	0,3514	0,3337
<i>L. plantarum</i>	Lac 28	0,3048	0,5000	0,5458	0,5063	0,4643
<i>L. plantarum</i>	Lac 29	0,3286	0,5055	0,5463	0,6405	0,5053
<i>L. plantarum</i>	Lac 30	0,2669	0,3398	0,5078	0,5259	0,4101
<i>L. plantarum</i>	Lac 31	1,4043	1,3956	1,2859	1,3544	1,3601
<i>L. plantarum</i>	Lac 32	1,4252	1,0582	1,2788	1,4319	1,2986
<i>L. plantarum</i>	Lac 33	1,0342	0,8714	1,2107	0,8981	1,0036
<i>L. plantarum</i>	Lac 34	0,8471	0,5779	1,1386	0,7945	0,8396
<i>L. plantarum</i>	Lac 35	1,0641	0,7685	1,1521	0,9532	0,9845
<i>L. plantarum</i>	Lac 36	1,3937	1,1612	1,2990	1,4515	1,3264
<i>L. plantarum</i>	Lac 37	1,4962	1,2868	1,3192	1,4079	1,3776
<i>L. fermentum</i>	Lac 38	1,4305	1,4563	1,3423	1,3995	1,4072
<i>L. agilis</i>	Lac 39	-0,0232	0,5157	-0,0222	1,2060	0,4191
<i>L. plantarum</i>	Lac 40	0,2382	0,5068	0,5838	0,7379	0,5167
<i>L. delbrueckii</i>	UFVH2B20	0,4173	0,4119	0,6856	0,6185	0,5334

APÊNDECE E. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para avaliar o crescimento celular obtido nos experimentos analisados por leitura da absorbância à 600 nm em leitora de microplacas Versamax (Molecular Devices), foi realizada a correlação entre as unidades formadoras de colônias e a absorbância obtida neste comprimento de onda. Os resultados estão apresentados na Tabela A.1., bem como a curva de correlação Figura A.1.

Com estes resultados é possível estimar os níveis de UFC/ml em todas as condições testadas, avaliando o melhor crescimento celular.

Tabela E.1. Correlação entre a absorbância em 600nm e a UFC/ml

Diluições	DO ₆₀₀	UFC/ml
1/8	0,440338	1,31 x 10 ⁸
1/10	0,412288	1,05 x 10 ⁸
1/16	0,254663	6,56 x 10 ⁷
1/20	0,210288	5,25 x 10 ⁷
1/32	0,137738	3,28 x 10 ⁷
1/40	0,111488	2,63 x 10 ⁷
1/64	0,073113	1,64 x 10 ⁷
1/80	0,078713	1,31 x 10 ⁷
1/128	0,046163	8,20 x 10 ⁶

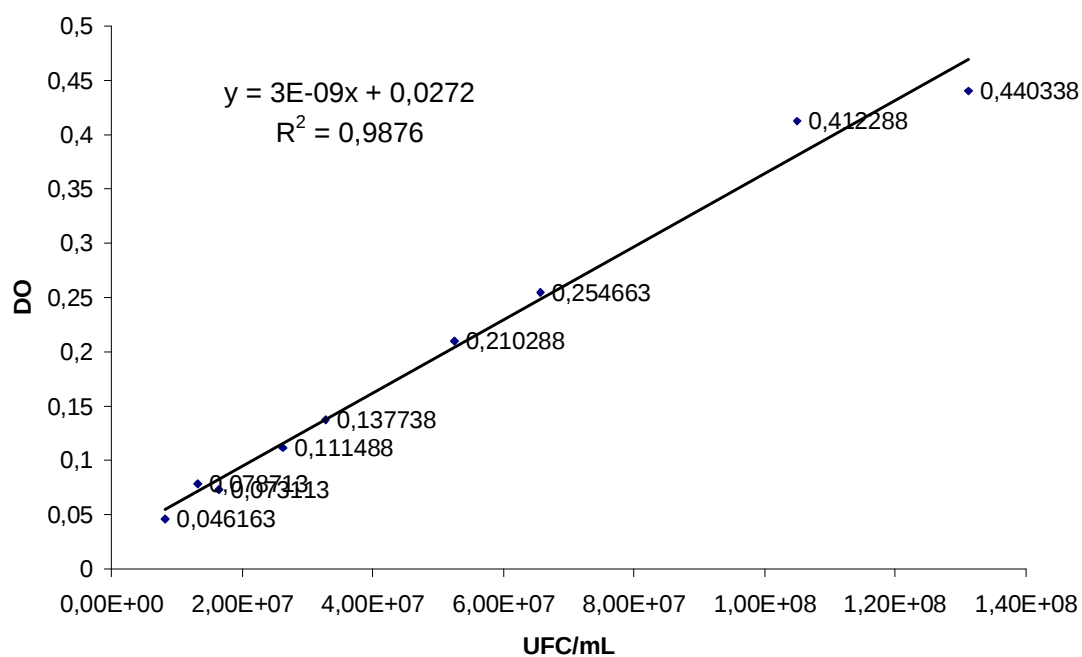


Figura E.1. Curva de correlação UFC/ml com densidade ótica em 600 nm.