

Mário Abatemarco Júnior

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E TECNOLÓGICA DE *Lactobacillus* spp.
ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR COMO CRITÉRIO DE SELEÇÃO DE
LINHAGENS PROBIÓTICAS**

Orientadora: Prof^ª. Regina Maria Nardi Drummond

Co-Orientadora: Prof^ª. Elisabeth Neumann

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

BELO HORIZONTE

2014

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Geralda (in memoriam) e Mário,
pela confiança e amor incondicional*

AGRADECIMENTOS

À Deus por cada dia de vida, por me dar saúde e perseverança para seguir em frente.

À minha mãe Geralda, presente no meu coração e nas mais belas lembranças da minha infância e adolescência (quanta saudade). Obrigado por ter me ensinado a escolher sempre o caminho do bem e a lutar bravamente pelos meus objetivos.

Ao meu pai, Mário, pela confiança, amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos da minha vida e em todas as minhas escolhas, sem fazer julgamentos (te amo muito cara).

Aos meus irmãos, Amanda e Giovanni e minha cunhada, Marina, pelo incentivo e carinho constantes.

Aos meus queridos sobrinhos, Eduardo, Marcelo, Bernardo, Giulia, André e Davi por me fazerem sentir o tio mais feliz do mundo.

Ao meu companheiro e grande amigo, Clécio, por sua amizade, amor e apoio incondicional.

À minha orientadora prof. Dra. Elisabeth Neumann, por acreditar no meu potencial, por sua postura profissional e ética exemplares, pela amizade e amor construídos ao longo desses 6 anos de convivência, pelos ensinamentos na bancada e dicas dentro de sala para melhorar a qualidade das minhas aulas.

À minha orientadora, prof. Dra. Regina, por aceitar a minha orientação, pelos ensinamentos e por ter me dado à oportunidade de lecionar Microbiologia de Alimentos no curso de especialização.

Ao prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, por ter concedido a minha primeira bolsa de Iniciação Científica pelo CNPq, pela abertura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos e disponibilização de todos os insumos e recursos financeiros indispensáveis à realização deste trabalho. Agradeço também pela gentileza com a qual sempre fui tratado e pelos deliciosos bolos de aniversário.

À prof. Dra. Sílvia Beleza de Moura, pelos momentos agradáveis durante o café e pelas deliciosas guloseimas da padaria Vianney fazendo com que os trabalhos dentro do laboratório ficassem bem mais prazerosos.

Ao prof. Dr. Álvaro, por ter me dado a primeira oportunidade de Iniciação Científica na UFMG, pela concessão da bolsa DTI-3 do CNPq e por todo o suporte técnico e intelectual durante todo o meu mestrado.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e se disponibilizado a contribuir com seus conhecimentos.

À Clélia, pela lavagem e zelo com os nossos materiais.

As minhas ICs, Jéssica, Nathane, Dalila e Tiffany, por toda a ajuda durante os experimentos.

Aos colegas do LEFM e LABio, Adriano, Bianca, Quésia, Karla, Rafaela, Ariane, Fabiana, Flaviano, Yasmin, Érica, Spencer e respectivos estagiários, pelo convívio agradável durante todos esses anos.

Aos amigos, Léo, Bruno, Mayra, Rafel Wesley, Sílvia Pietra, Bárbara, Carol, Tássia, Sílvia Maria, Maira, Samir, Marliete, Vanessa, Juliana, Rodrigo e Alide por toda a ajuda durante a execução desse trabalho, pelos *happy hours* na Tia Ruth sempre regado com muita cerveja e pastel de queijo, por beberem junto comigo sempre no início e final de cada experimento e por comemorarem comigo quando eles davam certo ou por me consolarem quando davam errado.

Aos meus amigos coltecanos, Paulina, Joyce, Dandara, Carol, Rodrigo e Marcus por provarem que quando existe amizade verdadeira, a distância não é capaz de destruir.

Muito obrigado a todos, essa vitória é nossa!!!

*“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Os grãos de kefir possuem uma microbiota rica em bactérias do ácido lático, especialmente *Lactobacillus*. O longo histórico de utilização desses microrganismos em alimentos aliado à ausência de fatores de virulência fazem desse gênero alvo interessante para pesquisa de novas linhagens microbianas com potencial probiótico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o potencial probiótico de 52 lactobacilos isolados de grãos de kefir de leite e água açucarada, pela verificação da tolerância às condições adversas do trato gastrointestinal (suco gástrico e sais biliares), do perfil de susceptibilidade à antimicrobianos, da capacidade antagonista contra bactérias patogênicas e da hidrofobicidade da superfície celular. Após esses testes, dez isolados foram selecionados e submetidos à liofilização na presença de diferentes crioprotetores, com posterior avaliação da sobrevivência e capacidade de reativação *in vitro* durante 30 dias de estocagem sob refrigeração. O número de células viáveis após 30 dias variou entre as culturas testadas e a presença dos crioprotetores contribuiu para a manutenção da viabilidade em nível superior a 10^8 UFC/g em oito dos dez isolados e resultou em melhor capacidade de reativação de todas as culturas liofilizadas. Após 180 dias de estocagem, o número de células viáveis de *L. satsumensis* 18P-A se manteve superior a 10^9 UFC/g, mesmo na ausência de crioprotetor. A população de *L. satsumensis* 23P3-L só se manteve acima de 10^9 UFC/g até 120 dias, na presença de crioprotetores. Quanto à capacidade de reativação, *L. satsumensis* 18P-A liofilizado e mantido sob refrigeração por 120 dias apresentou crescimento similar à cultura fresca com todos os crioprotetores testados, o mesmo não ocorreu para *L. satsumensis* 23P3-L. A atividade antagonista *in vitro* de *L. satsumensis* 18P-A contra bactérias patogênicas não foi alterada pelo processamento, assim como sua capacidade colonização do trato gastrointestinal de animais suíços isentos de germe. Os resultados obtidos demonstram que *L. satsumensis* 18P-A é um forte candidato ao uso como probiótico. Além disso, foi demonstrado que isolados de uma mesma espécie podem apresentar variações significativas em suas propriedades probióticas e/ou na capacidade de permanecer viáveis ao longo do processamento e estocagem, confirmando que a avaliação de aspectos tecnológicos e funcionais deve ser considerada para a seleção de estirpes microbianas probióticas de interesse industrial.

Palavras-chave: grãos de kefir, *Lactobacillus*, caracterização probiótica, liofilização, reativação

ABSTRACT

Kefir grains are plenty of lactic acid bacteria in their microbial composition, particularly *Lactobacillus*. The current use of these microorganisms in food combined with the absence of virulence factors make them interesting as potential probiotics. The objective of this study was to evaluate probiotic characteristics of 52 lactobacilli isolated from milk or sugary kefir grains, by checking the tolerance to simulated conditions of the gastrointestinal tract (gastric juice and bile salts), evaluating the antimicrobial susceptibility profile, antagonistic capacity against pathogenic bacteria and cell surface hydrophobicity. After these tests, ten isolates were selected and lyophilized in the presence of different cryoprotectants, with subsequent evaluation of the survival and *in vitro* reactivation abilities during 30 days of storage under refrigeration. The number of viable cells after 30 days ranged between cultures tested. The presence of cryoprotectants contributed to maintenance of viability in number higher than 10^8 cfu/g in eight isolates and resulted in enhanced capacity for reactivation of all lyophilized cultures. After 180 days of storage, the number of viable cells of *L. satsumensis* 18P-A remained higher than 10^9 cfu/g, even in the absence of cryoprotectant. The population of *L. satsumensis* 23P3-L only remained above 10^9 UFC/g until 120 days in the presence of cryoprotectants. Regarding the ability to reactivate after 120 days of storage, lyophilized *L. satsumensis* 18P-A showed growth as good as fresh culture with all cryoprotectants, what did not happened with *L. satsumensis* 23P3-L. The *in vitro* antagonistic activity of *L. satsumensis* 18P-A against pathogenic bacteria was not altered by lyophilization, as well as its germfree swiss mice gastrointestinal colonization capacity. The results show that *L. satsumensis* 18P-A is a strong candidate for use as probiotic. Furthermore, it was demonstrated that isolates of the same species can vary significantly in their probiotic features and/or ability to remain viable throughout the processing and storage conditions, confirming that the assessment of technological and functional aspects should be considered for the selection of probiotic strains of industrial interest.

Keywords: kefir grains, *Lactobacillus*, probiotic characterization, lyophilization, reactivation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. casei* 17U-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....45
- FIGURA 2** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. casei* 25P-L antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....46
- FIGURA 3** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. perolens* 11P3-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....47
- FIGURA 4** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. perolens* 17P2-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....47
- FIGURA 5** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. sastumensis* 23P3-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....48
- FIGURA 6** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. sastumensis* 18P-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....49
- FIGURA 7** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. mali* 21U2-A antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....50
- FIGURA 8** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. kefir* 24P3I-L antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....51
- FIGURA 9** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. kefiranofaciens* 8U-L antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....52
- FIGURA 10** – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de *L. diolivorans* 8U-L antes (T0), logo após a liofilização e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....52

FIGURA 11 – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de <i>L. satsumensis</i> 18P-A antes (T0) e nos tempos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....	58
FIGURA 12 – Contagem de células viáveis (LogUFC/g) de <i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3-L antes (T0) e nos tempos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias sob refrigeração a 10°C em formulações contendo diferentes crioprotetores.....	59
FIGURA 13 – Cinética de reativação de <i>L. casei</i> 25P-L em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C.....	63
FIGURA 14 – Cinética de reativação de <i>L. casei</i> 17U-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C.....	65
FIGURA 15 – Cinética de reativação de <i>L. perolens</i> 11P3-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C....	67
FIGURA 16 – Cinética de reativação de <i>L. perolens</i> 17P2-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C....	69
FIGURA 17 – Cinética de reativação de <i>L. mali</i> 21U2-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C....	71
FIGURA 18 – Cinética de reativação de <i>L. kefir</i> 24P3I-L em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C....	73
FIGURA 19 – Cinética de reativação de <i>L. kefiranofaciens</i> 8U-L em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C.....	75
FIGURA 20 – Cinética de reativação de <i>L. diolivorans</i> 1Z-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C a 10°C.....	77
FIGURA 21 – Cinética de reativação de <i>L. satsumensis</i> 18P-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C.	79
FIGURA 22 – Cinética de reativação de <i>L. satsumensis</i> 23P3-L em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e com 30 dias de armazenamento a 10°C.	81
FIGURA 23 – Cinética de reativação de <i>L. satsumensis</i> 18P-A em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a 10°C.....	83

FIGURA 24 – Cinética de reativação de <i>L. satsumensis</i> 23P3-L em caldo MRS a 37°C logo após a liofilização (T0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a 10°C.....	85
FIGURA 25 – Médias dos halos de inibição (mm) de <i>L. satsumensis</i> 18P-A liofilizado em sacarose 15% ou NaCl 0,9% contra bactérias patogênicas.....	86
FIGURA 26 – Imagem dos halos de inibição de <i>L. satsumensis</i> 18P-A liofilizado com sacarose 15% ou NaCl 0,9% e armazenados por 60 dias contra <i>E.coli</i> e <i>S. Typhimurium</i>	86
FIGURA 27 – Níveis populacionais (LogUFC/g) de <i>L. satsumensis</i> 18P-A cultura fresca, recém liofilizada (T1) e liofilizada com 45 dias de estocagem (T45) nas fezes dos animais gnotobióticos avaliados 1, 5 e 10 dias após a monoassociação.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Identificação molecular das espécies bacterianas isoladas dos grãos de kefir.....	31
TABELA 2 – Porcentagem de inibição de <i>Lactobacillus</i> spp. no teste de sensibilidade a suco gástrico artificial.....	40
TABELA 3 – Porcentagem de inibição de <i>Lactobacillus</i> spp. no teste de sensibilidade a sais biliares.....	40
TABELA 4 – Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Lactobacillus</i> spp.	41
TABELA 5 – Médias dos halos de inibição (mm) de <i>Lactobacillus</i> spp. (amostra produtora) contra bactérias patogênicas (reveladoras).....	43
TABELA 6 – Porcentagem de Adesão Microbiana a Solventes (MATS) de <i>Lactobacillus</i> spp.....	44
TABELA 7 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. casei</i> 17U-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	53
TABELA 8 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. casei</i> 25P-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	53
TABELA 9 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. perolens</i> 11P3-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	54
TABELA 10 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. perolens</i> 17P2-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)	54
TABELA 11 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. satsumensis</i> 23P3-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	55
TABELA 12 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. satsumensis</i> 18P-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	55

TABELA 13 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. mali</i> 21U2-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	56
TABELA 14 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. kefir</i> 24P3I-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	56
TABELA 15 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. kefiranofaciens</i> 8U-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	57
TABELA 16 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>L. diolivorans</i> 1Z-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30) a 10°C.....	57
TABELA 17 – Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P-A logo após a liofilização (T1) e com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento a 10°C.....	58
Tabela 18: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de <i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3-L logo após a liofilização (T1) e com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Kefir: definição, histórico e efeitos benéficos.....	17
1.2 Grãos de kefir: definição e composição microbiológica.....	19
1.3 Gênero <i>Lactobacillus</i>	20
1.4 Seleção de microrganismos probióticos: aspectos funcionais e tecnológicos.....	23
1.5 Liofilização.....	24
1.6 Crioprotetores.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Microrganismos.....	30
4.1.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	30
4.1.2 <i>Bactérias patogênicas</i>	31
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico de <i>Lactobacillus</i> spp.....	32
4.2.1 <i>Teste de sensibilidade a suco gástrico artificial</i>	32
4.2.2 <i>Teste de sensibilidade a sais biliares</i>	32
4.2.3 <i>Teste de susceptibilidade a antimicrobianos</i>	33
4.2.4 <i>Teste de antagonismo in vitro</i>	34
4.2.5 <i>Teste de hidrofobicidade de superfície celular</i>	34
4.3 Preservação de <i>Lactobacillus</i> spp.....	35
4.3.1 <i>Preparo da suspensão microbiana para liofilização</i>	35
4.3.2 <i>Liofilização e condições de estocagem</i>	35
4.3.3 <i>Avaliação da sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> spp. após liofilização e estocagem por 30 dias</i>	36
4.3.4 <i>Capacidade de reativação in vitro de <i>Lactobacillus</i> spp. após liofilização e estocagem por 30 dias</i>	36
4.3.5 <i>Avaliação da sobrevivência e capacidade de reativação in vitro das linhagens de <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P-A e 23P3-L liofilizadas e</i>	

<i>estocadas por 180 dias</i>	36
4.4 Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P-A	37
4.4.1 Teste de antagonismo <i>in vitro</i> a partir da cultura liofilizada	37
4.4.2 Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germe	38
4.4.3 Teste de antagonismo <i>ex vivo</i> contra <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	39
4.5 Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS	39
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico	39
5.1.1 Teste de sensibilidade a suco gástrico artificial	39
5.1.2 Teste de sensibilidade a sais biliares	40
5.1.3 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	41
5.1.4 Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	41
5.1.5 Teste de hidrofobicidade de superfície celular	42
5.2 Preservação de <i>Lactobacillus</i> spp. selecionados pelos testes de caracterização probiótica <i>in vitro</i>	44
5.2.1 Avaliação da sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> spp. após liofilização e estocagem	44
5.2.2 Capacidade de reativação <i>in vitro</i>	60
5.3 Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de <i>L. satsumensis</i> 18P-A	85
5.3.1 Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra bactérias patogênicas	85
5.3.2 Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germe	87
5.3.3 Teste de antagonismo <i>ex vivo</i> contra <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	88
6. DISCUSSÃO	89
6.1 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico de <i>Lactobacillus</i> spp	89
6.1.1 Teste de sensibilidade a suco gástrico artificial e a sais biliares	89
6.1.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	90
6.1.3 Antagonismo <i>in vitro</i>	91

6.1.4 <i>Teste de hidrofobicidade de superfície celular</i>	93
6.2 <i>Preservação de Lactobacillus spp. selecionados pelos testes in vitro</i>	94
6.2.1 <i>Avaliação da sobrevivência de Lactobacillus spp. após liofilização e estocagem</i>	94
6.2.2 <i>Capacidade de reativação in vitro</i>	97
6.3 <i>Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de Lactobacillus satsumensis 18P-A</i>	99
6.3.1 <i>Teste de antagonismo in vitro da linhagem contra bactérias patogênicas</i>	
6.3.2 <i>Capacidade de colonização do trato gastrintestinal de camundongos isentos de germe</i>	100
6.3.3 <i>Teste de antagonismo ex vivo contra S. Typhimurium e L. monocytogenes</i>	102
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Kefir: definição, histórico e efeitos benéficos

Kefir é uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, com pH variando entre 4,2 e 5,5, ou menor, obtida pela dupla fermentação (alcoólica e ácido-lática) do leite pelos grãos de kefir. Apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente espumoso e efervescente. A bebida pronta para o consumo possui ácido lático, assim como os ácidos fórmico, succínico e propiônico além de CO₂, álcool etílico, diferentes aldeídos e traços de álcool isoamílico e acetona e uma variedade de folatos (Güven & Gulmez, 2003). O ácido lático formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro. O produto possui ainda alta digestibilidade, que é atribuída à natureza do coágulo, cujas proteínas sofrem, durante a fermentação, desnaturação em diferentes níveis, obtendo assim um produto final de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (Hertzler & Clancy, 2003).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, o kefir deve ser constituído de menos que 10% de gordura de leite e um mínimo de 2,8% de proteína de leite possuindo 0,6% de acidez titulável, 10⁷ UFC/g de contagem microbiana total e 10⁴ UFC/g de levedura. No entanto, não há nenhuma menção ao conteúdo de etanol no produto (FAO/WHO, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define kefir como “leite fermentado com cultivo ácido-lático elaborado com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido lático, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*” (BRASIL, 2007)

A bebida tem sido consumida há milhares de anos na região das montanhas do Cáucaso, de onde é originária, mas foi apenas no final do século XIX que o consumo da bebida se popularizou fora da Rússia (Schneendorf e Anfiteatro, 2004). O termo kefir se origina do eslavo “keif” e significa “bem-estar” ou “bem-viver” sensações que eram descritas pelos consumidores da bebida após a sua ingestão. A bebida tem ganhado popularidade em várias partes do mundo incluindo sudoeste da Ásia, leste e norte da

Europa, América do Norte, Japão, África, Rússia e Brasil devido às suas propriedades nutricionais e terapêuticas (Sarkar, 2008).

Em países do leste europeu, o consumo de kefir é recomendado para pessoas saudáveis com o objetivo de reduzir o risco de doenças crônicas, além de ser recomendado para o tratamento de algumas desordens metabólicas, hipertensão arterial, doenças cardíacas isquêmicas e alergias (Saloff Coste, 1996; Farnworth, 1999; St-Onge, 2002; Farnworth, 2006). Os vários benefícios para a saúde humana alegados pela ingestão de kefir permitem classificá-lo como “alimento funcional” e segundo a Portaria nº 389, de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), “é alimento funcional todo aquele alimento ou ingrediente que, além das suas funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde humana”.

Os efeitos antibacteriano (Zacconi *et al.*, 1995), imunológico (Furukawa *et al.*, 1991; Thoreux e Schmucker, 2001), antitumoral (Furukawa *et al.*, 1990; Nagira *et al.*, 2002) e hipocolesterolêmico (Fang *et al.*, 2000; Plant&Conway, 2001) do kefir já foram demonstrados em vários estudos. Atividade cicatrizante também já foi verificada utilizando-se uma pomada à base de kefir em ratos albinos com uma ferida dorsal infectada com *Staphylococcus aureus*. (Rodrigues *et al.*, 2005).

Vários estudos têm demonstrado o efeito imunomodulador de kefir. Vinderola *et al.* (2005), alimentaram camundongos BALB/c com kefir cru e kefir pasteurizado e demonstraram que isto aumentou o número de células secretoras de IgA na lâmina própria e brônquios, além de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e pulmonares. Eles ainda mostraram que todos os parâmetros estudados voltaram aos valores de controle após uma semana sem administração da bebida, o que sugere haver baixo risco de super estimulação da resposta imune de mucosa com o consumo do leite fermentado. Em outro estudo, camundongos BALB/c alimentados com kefir cru e kefir pasteurizado em diferentes concentrações por 2, 5 e 7 dias consecutivos elevaram a produção de IL-4, IL-6 e IL-10 na lâmina própria. No entanto, menores concentrações de kefir foram necessárias para se obter o mesmo aumento quando comparado às doses de kefir pasteurizado durante o mesmo período de tempo, demonstrando a importância da presença de células viáveis para a imunomodulação (Vinderola *et al.*, 2006). Vinderola *et al.* (2006), administraram oralmente kefirano a camundongos BALB/c por 2, 5 e 7 dias consecutivos e observaram aumento do número

de células produtoras de IL-10, IL-6 e IL-12 na lâmina própria e aumento de IL-4 e IL-12 no fluido intestinal quando comparados ao grupo controle.

1.2 Grãos de kefir: definição e composição microbiológica

Os grãos de kefir são semelhantes a pedaços de couve-flor constituídos por um conjunto complexo de mais de 40 espécies de bactérias do ácido lático e leveduras que convivem em uma complexa relação simbiótica e se encontram firmemente aderidas e encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis que são secretados por algumas destas espécies. Essa matriz polissacarídica, também chamada de kefirano, retém uma comunidade relativamente estável e constante de microrganismos (Marshall, 1993).

Até o momento, não se conseguiu esclarecer a origem evolutiva dos grãos. Mesmo com a identificação dos isolados de sua microbiota, ainda não foi obtida sua formação espontânea em laboratório. Novos grãos de kefir só se formam da multiplicação e propagação de grãos existentes. Porém, alguns autores relatam que o povoado do Cáucaso utilizava de um odre de barro onde se estocava leite de cabra ou ovelha e depois eram adicionados fragmentos de estômago de carneiro ou veado, agitando de tempos em tempos, até a coagulação do produto. Neste ponto, retiravam o produto e não higienizavam o odre; adicionava-se mais leite como substrato e o processo se repetia. Então se formou uma crosta neste recipiente, sobretudo de microrganismos vivos, que se adaptaram ao meio e nele se propagaram (Liu e Moon, 1983). Atualmente, os grãos de kefir têm sido cultivados em outros substratos além do leite, a saber, açúcar mascavo, leite de soja e sucos de frutas sendo que a coloração dos mesmos depende do substrato utilizado para o cultivo. Os grãos são amarelos claro quando cultivados em leite, ocre e pardos se crescidos em açúcar mascavo ou purpúreos se cultivados em suco de uva (Guzel-Seidym *et al.*, 2000).

Nos grãos de kefir é encontrada uma diversidade microbiológica elevada que inclui espécies de leveduras, bactérias do ácido lático (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias do ácido acético e outros microrganismos ainda não descritos (Garrote *et al.*, 1997; 2001). A composição da população pode diferir, dependendo da origem dos grãos e dos diferentes métodos de cultivo (Garrote *et al.*, 2001). Em culturas lácteas encontra-se um polissacarídeo conhecido como kefirano ou como fator de crescimento de kefir (KGF), que é um bioproduto carboidratado secretado por algumas

bactérias dos grãos e que permite o encapsulamento dos microrganismos em uma matriz polissacarídea. É um exopolissacarídeo parcialmente solúvel em água composto por unidades repetitivas de galactose e glicose, na proporção de 1,1:0,9 (Micheli *et al.*, 1999). A microbiota dominante nos grãos de kefir apresenta bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* e *Streptococcus* e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Torula* (Schneendorf e Anfiteatro, 2004).

Várias bactérias do ácido lático têm sido isoladas de grãos de kefir e identificadas por testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares como: *Lactobacillus acidophilus* (Angulo *et al.*, 1993), *L. brevis* (Simova *et al.*, 2002), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Simova *et al.*, 2002), *L. delbrueckii* (Simova *et al.*, 2002; Whitthunh *et al.*, 2004), *L. helveticus* (Angulo *et al.*, 1993, Lin *et al.*, 1999; Simova *et al.*, 2002), *L. kefir* (Angulo *et al.*, 1993, Takizawa *et al.*, 1998; Garrote *et al.*, 2001, Zaniratti, 2012), *L. kefiranofaciens* (Takizawa *et al.*, 1998, Zaniratti, 2012), *L. plantarum* (Garrote *et al.*, 2001), *L. satsumensis*, *L. perolens*, *L. diolivorans*, *L. parafarraginis*, *L. mali*, *L. casei* (Zaniratti, 2012) *Leuconostoc mesenteroides* (Lin *et al.*, 1999; Garrote *et al.*, 2001; Whitthunh *et al.*, 2004), *Lactococcus lactis* (Garrote *et al.* 2001; Simova *et al.* 2002; Whitthunh *et al.*, 2004), *Streptococcus thermophilus* (Simova *et al.*, 2002), *Oenococcus oeni* (Zaniratti, 2012).

1.3 Gênero *Lactobacillus*

Bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são Gram-positivo, em forma de bastonetes ou cocobacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, microaerófilas e catalase-negativo. De acordo com o *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* (Garrity *et al.*, 2004), o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacilales*, família *Lactobacilaceae*, que engloba também os gêneros *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. Até o momento, o gênero apresenta 201 espécies e 29 subespécies descritas (Euzéby, 2014).

A divisão clássica do gênero está baseada em suas características metabólicas, na qual o microrganismo pode ser classificado de acordo com o tipo de fermentação: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório (Axelsson, 2004). Os lactobacilos homofermentativos obrigatórios incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido lático e não fermentam

pentoses ou gliconato. Os heterofermentativos obrigatórios englobam os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás, a partir da glicose, é uma característica marcante desses micro-organismos. Os heterofermentativos facultativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido-lático e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses micro-organismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos lático e acético (Vásquez *et al.*, 2005).

Os lactobacilos são encontrados em uma variedade de habitat, como cavidade oral, trato respiratório, gastrointestinal e urogenital de humanos e outros animais; associados aos vegetais, à matéria orgânica, além de solos, água, ou quaisquer outras fontes de substratos fermentáveis com alguns nutrientes especiais, como certas vitaminas, sais e aminoácidos. Estão presentes também em muitos tipos de alimentos, como por exemplo, iogurtes, carnes e derivados, queijos, bebidas fermentadas, cereais, sorvetes, manteigas, dentre outros (Hammes e Hertel, 2003). Devido a sua longa história de uso em fermentação de alimentos e ausência de fatores de virulência, os lactobacilos são geralmente reconhecidos como microrganismos seguros para o consumo (GRAS: *Generally Recognized As Safe*) (Adams e Marteau, 1995).

Em 1908, Ellie Metchnikoff (1845-1916) observou que os habitantes da Bulgária apresentavam elevada expectativa de vida. Metchnikoff associou este fenômeno ao alto consumo de alimentos contendo bactérias lácticas e sugeriu que a ingestão dessas bactérias era capaz de diminuir a quantidade de bactérias produtoras de toxinas no intestino, contribuindo assim para a longevidade dos habitantes daquele país. Desde então, o consumo de leites fermentados contendo lactobacilos viáveis é recomendado devido aos efeitos terapêuticos e nutricionais que estes microrganismos proporcionam no trato intestinal de humanos e animais (Fuller, 1997; Kaur *et al.*, 2002). Hoje, tanto lactobacilos como outros microrganismos que possuam comprovada ação benéfica sobre o hospedeiro são chamados de probióticos, que são “microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Vários autores ressaltam as propriedades probióticas de lactobacilos. Dentre estes trabalhos, podemos citar: produção de bacteriocinas e outras substâncias inibidoras de enteropatógenos (Bernet-Camard *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2001; De Waard *et al.*, 2002, Zheng *et al.*, 2013), efeito anticarcinogênico (Nagira *et al.*, 2002), elaboração de enzimas, proporcionando hidrólise parcial de proteínas e gorduras do leite e lactose,

aumentando a digestibilidade do produto, aumento da utilização de lactose em indivíduos intolerantes a este açúcar (Gilliland, 1984), inibição competitiva da adesão de enteropatógenos (Spencer & Clesson, 1998; Velraeds *et al.*, 1996), desconjugação de sais biliares (Klaver & Van Der Meer, 1995, Zheng *et al.*, 2013), efeito hipocolesterolêmico (Fang *et al.*, 2000; Plant & Conway, 2001, Zheng *et al.*, 2013) e estimulação do sistema imune do hospedeiro (Neumann *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1998; Ishida-Fujii *et al.*, 2007; Castanheira *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011).

Um grande número de evidências sugere que respostas imunes do tipo 1 geradas por lactobacilos probióticos na mucosa intestinal podem estimular imunidade celular sistêmica necessária para imunoterapia de câncer, para o controle de microrganismos intracelulares patogênicos e para o combate do envelhecimento do sistema imune em indivíduos idosos (Cross, 2002). A inibição de microrganismos patogênicos e toxigênicos por probióticos se dá, em geral, por produção de substâncias antimicrobianas ou por exclusão competitiva (Farnworth, 2006, Zheng *et al.*, 2013). Neste sentido, a adesão de bactérias potencialmente probióticas às células epiteliais pode contribuir significativamente para a exclusão competitiva de patógenos (Coconnier *et al.*, 1993, Zheng *et al.*, 2013).

Várias linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram isoladas e têm tido seu potencial probiótico intensamente caracterizado, sendo publicados vários efeitos benéficos advindos da sua utilização. Por exemplo, *L. rhamnosus* GG está associado à prevenção de diarreia após tratamento com antibióticos, tratamento de diarreia relacionada com a infecção por *Clostridium difficile*, redução dos sintomas da doença de Crohn, atividade anticarcinogênica e possui atividade de adjuvante imune (Pillai & Nelson, 2008; Basu *et al.*, 2009; Orlando *et al.*, 2009; Szajewska *et al.*, 2011); *L. casei* Shirota tem efeitos descritos na prevenção de distúrbios intestinais além de efeitos anticarcinogênicos (Lee & Salminen, 1995). *L. delbrueckii* UFV H2b20 protegeu comundongos suíços isentos de germe contra a infecção por *Listeria monocytogenes* pelo aumento da resposta imune efetora desses animais (Santos *et al.*, 2011). Atividade pró-inflamatória tem sido correlacionada à administração de diferentes espécies, como por exemplo, *L. casei* Shirota, *L. gasseri* e *L. johnsonii*. Efeitos anti-inflamatórios (como redução da produção de IL12, IL6 e Tnfa) têm sido observados na associação de *L. reuteri* com células dendríticas *in vitro* (NG *et al.*, 2009).

1.4 Seleção de microrganismos probióticos: aspectos funcionais e tecnológicos

Muitos aspectos devem ser considerados quando se pretende selecionar cepas com propriedades probióticas para o desenvolvimento de um produto comercial. Boas características funcionais e tecnológicas são os principais critérios analisados nas linhagens com finalidade industrial (Saarela *et al.*, 2000; Turner, Dritz e Minton, 2001; Murarolli, 2008; Sumita, 2007; Oelschlaeger, 2010).

Por definição, microrganismos probióticos devem proporcionar diversos efeitos benéficos à saúde do homem e de animais, tais como, antagonismo contra espécies patogênicas através da produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas (Apella *et al.*, 1992; Vignolo *et al.*, 1993; Mital & Garg, 1995, Singh *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2013), competição por nutrientes e por sítios de adesão em mucosas (Coconnier *et al.*, 1993), estimulação do sistema imune do hospedeiro (Isolauri *et al.*, 2001; Cross, 2002, Rizzelo *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 2011) produção de enzimas que melhoram a digestão dos alimentos ou detoxificam os metabólitos nefastos da microbiota (Gilliland, 1984; Chateau *et al.*, 1993, Singh *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2013) e efeito hipocolesterolêmico (Fang *et al.*, 2000; Plant & Conway, 2001, Zheng *et al.*, 2013). No entanto, um microrganismo só poderá ser considerado um probiótico se, além de proporcionar os efeitos benéficos citados acima, for capaz de se instalar e/ou permanecer estável no trato gastrintestinal do hospedeiro, ser completamente seguro para o consumo humano e permanecer viável durante o processamento e estocagem do produto alimentício ou formulação farmacêutica ao qual foi adicionado (Lee & Salminen, 1995; Neumann *et al.*, 1995, Farnworth, 2008; Strasser *et al.*, 2008; Niveliez *et al.*, 2012).

Diversos fatores podem interferir nas propriedades citadas, desde o isolamento (meios de culturas utilizados, condições de incubação) e preservação das culturas (temperatura, método de conservação, presença de agentes protetores) até o desenvolvimento, estocagem e comercialização das formulações que irão veicular a cultura probiótica (alimento ou formulação farmacêutica, método de produção e condições de estocagem). O crescente interesse pelo uso de probióticos em humanos e animais tem demandado o desenvolvimento de formulações probióticas que garantam a viabilidade, a estabilidade e a concentração adequada das células durante longos períodos de estocagem (Carvalho *et al.*, 2003, 2004). Até o momento, a manutenção da viabilidade celular parece ser fundamental para a eficiência do efeito probiótico (Del

Piano *et al.*, 2006). Em se tratando de bactérias lácticas de uso industrial, a viabilidade celular é essencial para a obtenção de produtos fermentados com características reológicas e sensoriais padronizadas e estáveis. Além disso, maximizar a vitalidade das células durante a secagem e estocagem é importante tanto econômica como tecnologicamente (Li *et al.*, 2011). Diversos métodos de secagem vêm sendo testados para a manutenção de bactérias lácticas como, por exemplo, a liofilização (*freeze-drying* ou secagem a frio) e o *spray-drying* (ou secagem a quente). A secagem a quente é um método classicamente utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica para a conservação de uma vasta quantidade de produtos, como por exemplo, leite, ovos e sabão (Rosa, Tsukada & Freitas, 2003). Muitas tentativas para utilização dessa metodologia, como alternativa mais econômica à liofilização ou congelamento, para preservação de bactérias ácido-lácticas vêm sendo realizadas (To & Etzel, 1997; Lian, Hsiao, & Chou, 2002, Paéz *et al.*, 2013). No entanto, o número de trabalhos acumulados na literatura científica que demonstram as vantagens dessa técnica para preservação de microrganismos, em relação à liofilização, é limitado (Peighambardoust, Tafti & Hesori, 2011).

1.5 Liofilização

A liofilização (ou *freeze-drying*) é um processo de secagem que consiste no congelamento prévio da amostra com posterior sublimação da água sob condição de um vácuo intenso cujo produto obtido é um sólido esponjoso de fácil ressuspensão. Culturas liofilizadas têm vantagens, em relação à culturas preservadas por outros métodos, por apresentarem alta viabilidade e funcionalidade por longo tempo de estocagem (Selmer-Olsen *et al.*, 1999). A liofilização tem sido o método de escolha para preservar culturas há décadas em coleções de culturas de todo o mundo, incluindo a *American Culture Type Collection* (ATCC). No entanto, o sucesso da liofilização depende de uma série de fatores, tais como a linhagem microbiana, fase de crescimento em que a célula se encontra antes da desidratação, concentração inicial da cultura, metodologia empregada para liofilização, agente crioprotetor e condições de reidratação (Schoug *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006).

Durante o congelamento da amostra, as células microbianas se expõem a efeitos deletérios, com danos, sobretudo à membrana plasmática e à parede celular, que estão relacionados à formação de cristais de gelo intra e extracelular, ao fluxo de água para

fora da célula (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos (Hubálek, 2003; Costa, 2010). À medida que a temperatura cai, a solução extracelular começa a congelar e, quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido, que passa a exibir maior pressão osmótica. De modo compensatório, ocorre um efluxo de água da célula para o meio extracelular promovendo, conseqüentemente, o aumento da concentração de solutos intracelular. Os efeitos nocivos do congelamento decorrem da desidratação da célula microbiana e da elevada concentração de íons do meio intracelular (Wolfe & Bryant, 2001; Acker & McGann, 2003; Hubálek, 2003). A velocidade de congelamento influencia no tamanho e forma dos cristais de gelo. Em altas taxas de congelamento, ocorre a formação de pequenos cristais de gelo e em grande quantidade, com mínimo deslocamento de água. Em condições de congelamento lento, os cristais formados são maiores e em menor quantidade, ocasionando a ruptura das células, a injúria celular por força do aumento da pressão osmótica e a precipitação irreversível ou a desnaturação dos constituintes coloidais da célula (Prista, 1993).

Li *et al.* (2011) demonstraram que a integridade e a fluidez da membrana de *L. reuterii* CICC6226 se mantiveram quando liofilizada em trealose ou leite desnatado a 10%. Zayed & Ross (2004) demonstraram efeito protetor de trealose, sacarose e leite desnatado (e da mistura dessas três substâncias) na viabilidade de *L. salivarius* após liofilização. Vários outros autores tem estudado a capacidade de sobrevivência de *Lactobacillus* spp. após processos de liofilização, demonstrando que a viabilidade das células depende de muitas variáveis como linhagem, meio de cultivo do microrganismo, carreador e veículo de ressuspensão, temperatura de congelamento da amostra, tempo de exposição ao frio e condições de estocagem do produto liofilizado (Ferreira *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Otero *et al.*, 2007; Golowczyk *et al.*, 2009; Semyonov *et al.*, 2010).

Um dos maiores desafios da criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas, resultando em perda da permeabilidade com conseqüente morte da célula. Uma forma de minimizar os danos causados à células microbianas durante o congelamento é utilizar substâncias protetoras que podem ser adicionadas no meio de cultura durante o crescimento do microrganismo, ou imediatamente antes do congelamento. Essas substâncias incluem leite desnatado,

soro, betaína, adonitol, glicerol, glicose, sacarose, trealose e polímeros tais como dextranos (Hubalek, 2003; Zayed & Roos, 2004).

1.6 Crioprotetores

Os agentes crioprotetores reduzem o estresse físico causado durante o congelamento das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (Lima, 2011). A presença de um agente crioprotetor apropriado na composição do meio utilizado para o congelamento geralmente aumenta a sobrevivência de micro-organismos mantidos a temperaturas abaixo de 0°C.

Os agentes crioprotetores têm sido classificados de formas variadas. Uma das mais tradicionais divisões consiste na classificação desses aditivos quanto à capacidade de penetração em materiais biológicos: crioprotetores penetrantes ou intracelulares, como metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicerol; e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares, como lactose, trealose, sacarose, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol entre outros (Meryman, 1971, Santin, Blume & Mondadori, 2009).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de micro-organismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (Meryman, 1974; Hubálek, 2003). Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como, reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Também se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (Nash, 1966; Hubálek, 2003).

Embora muitos trabalhos correlacionem altas taxas de sobrevivência após liofilização com utilização de crioprotetores, os mecanismos exatos pelos quais cada um deles atua ainda precisam ser esclarecidos. Algumas informações disponíveis na literatura ajudam a justificar a utilização desses açúcares como crioprotetores. A

trealose, um dissacarídeo não redutor, é um crioprotetor comumente utilizado na liofilização de microrganismos. A temperatura de transição vítrea (T_g) da trealose é suficientemente alta para prevenir a formação de cristais de gelo (Morgan *et al.* 2006; Pehkonen *et al.*, 2008) e, subsequentemente, estabilizar a bicamada lipídica e a estrutura das proteínas de membrana. A lactose, açúcar abundante no leite, possui temperatura de transição vítrea e outras propriedades térmicas muito próximas às da trealose (Pehkonen *et al.*, 2008). King & Su (1994) relacionaram a proteção exercida pelo leite sobre as células de *Lactobacillus acidophilus* submetidas à desidratação pela formação de um revestimento protetor pelas proteínas do leite ao redor da parede celular do microrganismo. Hubálek (2003) definiu sacarose, trealose e leite desnatado como crioprotetores não penetrantes ou extracelulares capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. A preservação de lactobacilos com potencial probiótico em alginato de cálcio tem mostrado resultados interessantes (Sultana *et al.*, 2000). Kearney *et al.*, (1990) compararam a sobrevivência após a liofilização de *L. plantarum* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio com as células livres. Taxas maiores de sobrevivência foram alcançadas pela utilização do polímero. O amido, polissacarídeo amplamente utilizado na indústria farmacêutica como excipiente nas formulações de comprimidos e cápsulas por sua ação lubrificante (Prista, 1996), é também utilizado na indústria alimentícia para elaboração de produtos congelados por sua ação espessante, melhorando a consistência e a textura do alimento além de contribuir para a diminuição da sinérese (Holmes & Solender, 1981).

Apesar de os crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (Oliveira, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Um dos maiores problemas enfrentados pela medicina nos tempos atuais é o tratamento das infecções bacterianas. O uso de antimicrobianos, de forma racional ou não, causa um desequilíbrio nas populações microbianas do trato gastrointestinal que muitas vezes se manifesta na forma de diarreias que podem ter conseqüências graves dependendo das condições de saúde do indivíduo. Outro ponto importante é a multiresistência bacteriana frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado que, hoje, já é reconhecida como um problema de saúde pública. A possibilidade do uso de probióticos como alternativa à utilização de antimicrobianos, tanto em seres humanos quanto em animais, tem encorajado muitos pesquisadores a buscar novas linhagens microbianas com características probióticas em diversos ecossistemas. As espécies de *Lactobacillus* apresentam potencial probiótico considerável e por isso tem sido objeto de estudo do grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos deste Departamento.

A microbiota de grãos de kefir é rica em bactérias do ácido láctico e, em especial, *Lactobacillus*, o que faz dos grãos uma fonte segura desses microrganismos. Em projeto anterior do nosso grupo foram isoladas várias espécies de *Lactobacillus* de grãos de kefir cultivados em leite ou água açucarada. É do nosso interesse conhecer o potencial probiótico desses microrganismos com o objetivo de, em médio e longo prazo, poder recomendar o uso dos mesmos. Pretendemos, ainda, investigar se a matriz alimentar na qual os grãos de kefir são cultivados pode influenciar no potencial probiótico das espécies isoladas. Outro fato importante é que essas bactérias poderão ser utilizadas no futuro como componentes de culturas iniciadoras para produção de kefir em escala industrial, o que ainda não é uma realidade no Brasil. Para tanto, é importante preservar de forma viável as culturas durante longo tempo, em condições compatíveis com a realidade industrial, e um dos métodos mais eficientes para esse fim é a liofilização.

Diante do exposto, e em face aos critérios determinados pela Organização Mundial da Saúde para a seleção de probióticos, pretendeu-se avaliar as propriedades funcionais, *in vitro* e *in vivo*, de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir, bem como verificar a capacidade das mesmas de permanecerem viáveis após secagem a frio.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcional e tecnologicamente *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir cultivados em leite ou em água açucarada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1.Caracterizar o potencial probiótico, *in vitro*, de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir pela verificação da tolerância às condições adversas do trato gastrointestinal (suco gástrico e sais biliares), do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, da capacidade antagonista contra bactérias patogênicas e da hidrofobicidade da superfície celular

3.2.2. Submeter os isolados com características probióticas desejáveis ao processo de liofilização na presença de concentrações diferentes de diversos agentes crioprotetores (leite desnatado, sacarose, trealose, amido e alginato de sódio).

3.2.3. Avaliar a viabilidade celular e a capacidade de reativação *in vitro* dos isolados com características probióticas desejáveis, após o processo de liofilização em diferentes formulações de crioprotetores e estocagem sob refrigeração durante 30 dias.

3.2.4. Avaliar a viabilidade celular e a capacidade de reativação *in vitro* de *L. satsumensis* 18P-A e *L. satsumensis* 23P3-L, após liofilização em diferentes formulações de crioprotetores e estocagem sob refrigeração durante 180 dias.

3.2.5. Verificar o efeito do processo de liofilização sobre a atividade antagonista *in vitro* de *L. satsumensis*18P-A contra bactérias patogênicas Gram positivo e Gram negativo.

3.2.6. Verificar o efeito do processo de liofilização sobre a capacidade de colonização e resistência às condições do trato gastrointestinal *in vivo* de *L. satsumensis* 18P-A em camundongos suíços isentos de germe e na atividade antagonista *ex vivo* contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium e *Listeria monocytogenes*.

4. METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1. Microrganismos

4.1.1. *Lactobacillus* spp.

Foram utilizadas cinquenta e duas culturas de *Lactobacillus* spp. isoladas de grãos de kefir cultivados em leite ou água açucarada, em um trabalho prévio (Zanirati, 2012). A identificação foi feita por PCR ARDRA de acordo com MOREIRA *et al.* (2005) ou pelo sequenciamento parcial do 16S RNAr no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Departamento de Biologia Geral ou no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, respectivamente. Os isolados pertencem às espécies *L. casei*, *L. kefir*, *L. mali*, *L. satsumensis*, *L. perolens*, *L. diolivorans*, *L. kefiranofaciens* e *L. parafarraginis*, conforme apresentado na Tabela 1. As bactérias foram mantidas a -80°C em caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, Difco, Sparks, EUA), adicionado de 30% de glicerol a 80% (v/v) esterilizado. Para todos os testes *in vitro* de caracterização probiótica, as culturas foram previamente ativadas em caldo MRS (Difco, Sparks, EUA), a 37°C durante 24-48 horas em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, por dois repiques sucessivos.

Tabela 1: Identificação molecular das espécies bacterianas isoladas dos grãos de kefir

Isolado	Espécie	Isolado	Espécie
22P2	<i>L. casei</i>	12P	<i>L. parafarraginis</i>
23P	<i>L. mali</i>	13P	<i>L. perolens</i>
23P3	<i>L. satsumensis</i>	13P2	<i>L. casei</i>
24P3I	<i>L. kefir</i>	13P3	<i>L. casei</i>
25P	<i>L. casei</i>	14P	<i>L. casei</i>
1P	<i>L. kefiranofaciens</i>	14P2	<i>L. perolens</i>
1P3	<i>L. kefiranofaciens</i>	16P	<i>L. parafarraginis</i>
2P2	<i>L. kefiranofaciens</i>	16P3	<i>L. perolens</i>
2P3	<i>L. satsumensis</i>	17P	<i>L. casei</i>
3P2	<i>L. kefir</i>	17P2	<i>L. perolens</i>
3P3	<i>L. kefir</i>	18P	<i>L. satsumensis</i>
4P2I	<i>L. kefir</i>	19P	<i>L. perolens</i>
4P3I	<i>L. kefir</i>	19U	<i>L. mali</i>
4P3II	<i>L. kefir</i>	20U	<i>L. casei</i>
6P	<i>L. kefiranofaciens</i>	20U1	<i>L. casei</i>
3U2	<i>L. kefir</i>	20U2	<i>L. casei</i>
8U	<i>L. kefiranofaciens</i>	21U1	<i>L. mali</i>
8P	<i>L. casei</i>	21U2	<i>L. mali</i>
8P2	<i>L. casei</i>	22U	<i>L. mali</i>
8P3	<i>L. casei</i>	1Z	<i>L. diolivorans</i>
9P2	<i>L. casei</i>	15U	<i>L. casei</i>
10P	<i>L. satsumensis</i>	15U1	<i>L. casei</i>
10P2	<i>L. satsumensis</i>	15U2	<i>L. casei</i>
11P	<i>L. perolens</i>	16U	<i>L. casei</i>
11P2	<i>L. perolens</i>	17U	<i>L. casei</i>
11P3	<i>L. perolens</i>	18U	<i>L. casei</i>

4.1.2. Bactérias patogênicas

Para os experimentos de antagonismo *in vitro* e *ex vivo*, foram utilizadas como reveladoras as linhagens bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25723), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 14028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) por serem patógenos de importância em saúde pública. Todas essas linhagens bacterianas pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos. As bactérias foram ativadas por dois repiques sucessivos em caldo BHI (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) incubados em aerobiose por 24 horas a 37°C. Todas as amostras foram

conservadas em tubos criogênicos contendo 1mL de caldo BHI acrescido de 30% de glicerol 80% (v/v) esterilizado e mantidas em freezer -80°C.

4.2. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de *Lactobacillus* spp.

4.2.1. Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial

Para o teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial foi utilizado o protocolo estabelecido no trabalho de Silva *et al.*, 2013. As culturas de lactobacilos previamente ativadas foram distribuídas em dois microtubos e, então, lavadas duas vezes com solução salina 0,9% (p/v) por centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto (Jouan, B4i). Ao precipitado de cada tubo foi adicionada solução salina 0,9% pH 7,0 (tubo controle) ou suco gástrico artificial (NaCl 2.g.L⁻¹, pepsina 3.2 g.L⁻¹, pH 2,5). Os microtubos foram incubados a 37°C por 2h e, posteriormente, centrifugados nas mesmas condições anteriores e o precipitado foi ressuspendido em caldo MRS.

A fim de se avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200µL/poço dos inóculos do controle e das amostras tratadas com suco gástrico artificial, em triplicata, em uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{600nm} a cada 30 minutos, durante 18 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 7.0 pela fórmula $(CT-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente. As linhagens de lactobacilos foram classificadas como sensíveis (% inibição >60%), tolerantes ($60\% \geq \%inibição \geq 40\%$) e resistentes (% inibição <40%).

4.2.2. Teste de sensibilidade aos sais biliares

Para o teste de sensibilidade aos sais biliares foi utilizado o protocolo estabelecido no trabalho de Silva *et al.*, 2013. Foram preparados inóculos a 2% v/v em caldo MRS puro (controle) ou MRS suplementado com 0,3% de sais biliares (Oxgall, Difco, Sparks, E.U.A) de cada cultura de lactobacilos.

A fim de se avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200µL/poço dos inóculos do controle e das amostras desafiadas com sais biliares, em triplicata, em uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{600nm} a cada 30 minutos, durante 18 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 7.0 pela fórmula $(CT-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente. As linhagens de lactobacilos foram classificadas como sensíveis (% inibição >60%), tolerantes ($60\% \geq \%inibição \geq 40\%$) e resistentes (%inibição <40%).

4.2.3. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos, em duplicata. Para cada antimicrobiano testado, os microrganismos foram classificados como sensível, moderadamente sensível ou resistente de acordo com os pontos de corte sugeridos por CHARTERIS *et al.* (1998) e ANVISA (2005). Para este teste, as culturas de lactobacilos foram inoculadas em ágar MRS e incubadas a 37°C por 24-48h, em anaerobiose. A partir da cultura em meio sólido, foram preparadas suspensões de cada lactobacilos em solução salina 0,9% (p/v), esterilizada, até atingir a turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a cerca de 10^8 UFC/mL. Alíquotas de 0,1mL das suspensões bacterianas foram então semeadas em ágar MRS com o auxílio de um *swab* estéril. Os antimicrobianos testados foram: Tetraciclina 30µg (TET), Ampicilina 10µg (AMP), Gentamicina 10µg (GEN), Amicacina 30µg (AMI), Eritromicina 15µg (ERI), Ceftriaxona 30µg (CRO), Cloranfenicol 30µg (CLO), Oxacilina 1µg (OXA), Penicilina G 10U (PEN), Amoxicilina 10µg (AMO) e Vancomicina 30µg (VAN). Após a disposição dos discos impregnados com antimicrobianos, as placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas, em aerobiose e a medida dos halos de inibição foi feito com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão).

4.2.4. Teste de antagonismo *in vitro*

O teste *in vitro* para verificar a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla, adaptado de Nardi *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2001), em duplicata. Uma micro-gota de 5 μ L de cada cultura de lactobacilo previamente ativada (cultura produtora) foi inoculada em ágar MRS e incubada a 37°C por 24-48 horas em anaerobiose para o crescimento do microrganismo. Para interromper a multiplicação microbiana, a cultura foi exposta ao vapor de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida, as placas foram abertas pelo mesmo tempo para evaporação do solvente residual e uma sobrecamada de 10 mL de ágar BHI semi-sólido (ágar bacteriológico 0,75% p/v) inoculado com 200 μ L de uma cultura bacteriana patogênica reveladora (item 4.1.2) foi espalhada sobre o ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas e os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). As amostras foram consideradas produtoras de substâncias antagonistas quando houve halo de inibição de crescimento da bactéria reveladora, independentemente do tamanho.

4.2.5. Teste de hidrofobicidade de superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada pela medida do MATS (Microbial Adhesion to Solvents) (Pelletier *et al.*, 1997; Kos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013). Culturas de lactobacilos previamente ativadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes e a turbidez foi ajustada para uma OD_{600nm} de 0.6-0,9 com 1mL de uma solução de KNO₃ 0,1M, pH 6.2 (A₀). Um volume de 0.6 ml de xileno (solvente apolar) foi adicionado a 3,6 ml da suspensão microbiana e após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas por 2 minutos em vórtex. A fase aquosa foi removida após 50 minutos de repouso e sua OD_{600nm} foi medida (A₁). A porcentagem de MATS foi calculada segundo a fórmula $(A_0 - A_1 / A_0) \times 100$. As culturas de lactobacilos com %MATS >66% foram consideradas hidrofóbicas; aquelas com %MATS entre 33% e 66% foram consideradas moderadamente hidrofóbicas e aquelas com %MATS <33% foram classificadas como hidrofílicas. O experimento foi realizado em duplicata.

4.3. Preservação de *Lactobacillus* spp.

Após os testes de caracterização probiótica, foram selecionadas as linhagens 25P-L, 17U-A (*L. casei*), 11P3-A, 17P2-A (*L. perolens*), 18P-A, 23P3-L (*L. satsumensis*), 21U2-A (*L. mali*), 24P3I-L (*L. kefir*), 1Z-A (*L. diolivorans*), 8U-L (*L. kefiranofaciens*) para serem submetidas ao processo de desidratação por liofilização seguido de estocagem a 10°C. As letras “A” ou “L” colocadas no final do código de cada isolado fazem referência ao meio de cultivo no qual eram cultivados os grãos de kefir de onde o microrganismo foi isolado, “água açucarada” ou “leite”, respectivamente.

4.3.1. Preparo da suspensão microbiana para liofilização

Cada microrganismo foi ativado separadamente (como descrito para os testes de caracterização probiótica *in vitro*). Após ativação, cada cultura microbiana foi aliqüotada em onze tubos Falcon®, centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos e lavada duas vezes com solução salina 0,9% (NaCl 0,9 % p/v) estéril. Os precipitados obtidos pela centrifugação foram ressuspensos nas seguintes soluções crioprotetoras: leite desnatado (*Skim milk*, Difco, Sparks, EUA) 10 e 20% p/v; trealose (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A) 5 e 10% p/v; sacarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A) 15 e 25% p/v; alginato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) 0,5 e 1% p/v; amido (Cromoline, São Paulo, Brasil) 1 e 2% p/v e como controle foi utilizada solução salina (NaCl 0,9% p/v), (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) totalizando onze formulações para cada lactobacilo testado. A biomassa de células microbianas foi ressuspensa num volume de solução crioprotetora de forma a perfazer um número mínimo inicial de 10⁹ UFC/ml.

4.3.2. Liofilização e condições de estocagem

A técnica de liofilização utilizada foi adaptada dos trabalhos de Bolla *et al.* (2010) e Li *et al.* (2011). De cada suspensão microbiana, foram preparados sete frascos de vidro com o volume de 1,0mL que foram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido e desidratados em liofilizador (modelo K105, Liotop, Brasil) por 24 horas a uma temperatura de -98°C e pressão de 10 mmHg. Finalizado o processo de

liofilização, os frascos foram selados com tampa de borracha e lacre de alumínio. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 10°C.

4.3.3. Avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus* spp. após liofilização e estocagem por 30 dias

A contagem de células viáveis de cada cultura foi realizada antes (T0), logo após a liofilização (T1) e em diferentes tempos (7, 14 e 30 dias) de estocagem sob refrigeração a 10°C. Para tanto, as células desidratadas foram ressuspendidas em 1,0mL de água destilada estéril, diluídas em solução salina (NaCl 0,9 % p/v) e plaqueadas em ágar MRS pela técnica *pour-plate*, em duplicata. O número de células viáveis foi determinado após 48 horas de incubação em aerobiose a 37°C. A quantidade de células viáveis foi expressa em logUFC/g e a porcentagem de sobrevivência calculada pela fórmula: $\frac{\log\text{UFC/g (T1 ou T30)}}{\log\text{UFC/g (T0)}} \times 100$

$$\log\text{UFC/g (T0)}$$

Antes da liofilização (T0), a porcentagem de sobrevivência foi considerada 100%.

4.3.4. Capacidade de reativação *in vitro* de *Lactobacillus* spp. após liofilização e estocagem por 30 dias

Para avaliar a capacidade de reativação dos microrganismos, foi utilizado o método descrito no trabalho de Martins *et al* (2007), adaptado para microplacas. Foram preparados inóculos a 2% (p/v) em caldo MRS a partir de uma cultura fresca de cada uma das linhagens de lactobacilos selecionadas e a partir de culturas recém liofilizadas (T1) e liofilizadas com 30 dias de armazenamento a 10°C (T30). Foram distribuídos 200µL dos meios inoculados, em triplicata, em poços de uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37°C. O crescimento das culturas foi acompanhado pela leitura de OD_{600nm} a cada 30 minutos, durante 18 horas. A curva de reativação foi construída com a média dos resultados da OD_{600nm}.

4.3.5. Avaliação da sobrevivência e capacidade de reativação *in vitro* das linhagens de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A e 23P3-L liofilizadas e estocadas por 180 dias

Culturas ativas de *L. satsumensis* 18P-A e 23P3-L foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes com solução salina 0,9% (NaCl 0,9 % p/v) estéril. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em solução de sacarose a 15% (p/v) de forma a perfazer um número mínimo inicial de aproximadamente 10^9 UFC/ml. As suspensões bacterianas foram liofilizadas e estocadas conforme descrito no item 4.3.2 por um período de 180 dias. A avaliação da sobrevivência foi realizada como descrito nos item 4.3.3 logo após a liofilização (T1) e nos tempos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem a 10°C. A capacidade de reativação *in vitro* foi avaliada conforme descrito no item 4.3.4 logo após a liofilização (T1) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias.

4.4. Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A

A linhagem *Lactobacillus satsumensis* 18P-A foi selecionada para os ensaios subsequentes por ter apresentado os melhores resultados em relação ao número de células viáveis ao longo do período de estocagem após liofilização e pela melhor capacidade de reativação *in vitro*.

4.4.1. Teste de antagonismo *in vitro* a partir da cultura liofilizada

As suspensões de *L. satsumensis* 18P-A liofilizadas, na presença do crioprotetor sacarose 15% (p/v) ou com NaCl 0,9% (p/v), com 60 dias de armazenamento, foram ressuspensas em água destilada estéril. Cinco microlitros de cada suspensão foram depositados sobre ágar MRS, seguindo-se incubação a 37°C por 24-48 horas em anaerobiose para o crescimento do microrganismo. Para interromper a multiplicação microbiana, a cultura foi exposta a vapor de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida, as placas foram abertas pelo mesmo tempo para evaporação do solvente residual e uma sobrecamada de 10 mL de ágar BHI semi-sólido (ágar bacteriológico 0,75% p/v) inoculado com 200µL de uma cultura bacteriana patogênica reveladora (item 4.1.2) foi espalhada sobre o ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas e os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão).

4.4.2 Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germe

Foram utilizados camundongos isentos de germes (IG), de 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem NIH (Taconic, Germantown, EUA). Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sendo mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, EUA) e manuseados de acordo com as técnicas já estabelecidas (Pleasant, 1974) e adaptadas às nossas condições (Silva, 1986). Para os experimentos, os animais receberam ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, BR) e água, esterilizados por calor úmido, *ad libitum*. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands) no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as regras estabelecidas pelo “Colegio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006). O presente trabalho de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, sob protocolo nº 096/2011.

Os animais foram divididos em quatro grupos com quatro animais cada: grupo GF, que recebeu a cultura 18P-A fresca ativa (antes da liofilização); grupo GL1, que recebeu a cultura recém liofilizada; grupo GL45, que recebeu a cultura 45 dias após liofilização e grupo GC (controle), que recebeu água destilada estéril. Todos os grupos experimentais receberam uma dose única de 0,1mL de uma suspensão com aproximadamente 10^8 UFC/mL das diferentes culturas por inoculação intragástrica. O grupo controle recebeu 0,1mL de água destilada estéril também por inoculação intragástrica. A capacidade de colonização foi avaliada durante 10 dias pela contagem do número de células viáveis nas fezes dos animais (Martins *et al.*, 2007). Nos dias 1, 5 e 10 após o inóculo, as fezes dos animais foram colhidas por estimulação anal, preparadas as diluições (de 10^{-1} até 10^{-8}) que foram plaqueadas em ágar MRS (Difco, Sparks, E.U.A) pela técnica *pour-plate*, em duplicata, seguindo-se incubação em aerobiose por 48 horas. O resultado foi expresso em logUFC/g de fezes.

4.4.3. Teste de antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

O teste *ex vivo* foi realizado conforme descrito por Nicoli & Raibaud (1990), Ramare *et al.* (1993) e Silva *et al.* (2001). As fezes de animais dos grupos experimentais e controle do experimento anterior foram coletadas no 10º dia de monoassociação e colocadas em placas com ágar MRS (Difco, Sparks, E.U.A). Após refrigeração (10°C) por 24h, as placas foram expostas a vapor de clorofórmio por 30 minutos e posteriormente foram mantidas abertas para evaporação do solvente residual. Uma sobrecamada de 10 mL de ágar BHI semi-sólido (ágar bacteriológico 0,75% p/v), inoculado com 200µL de cultura ativa de *S. Typhimurium* ou *L. monocytogenes*, foi espalhada sobre o ágar MRS. As placas foram incubadas por 18-24h a 37°C em aerobiose e o halo de inibição de crescimento foi medido com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão).

4.5 Análises estatísticas

Para a confecção dos gráficos e análises estatísticas dos resultados (quando se aplicou) foi utilizado o *software* GraphPad 5 Prism® (GraphPad Software Inc.). Para o ensaio de colonização em animais isentos de germe, foi utilizado o teste *two-way* ANOVA para análise de variâncias e o teste de Tukey foi utilizado para comparação entre as médias ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de *Lactobacillus* spp.

5.1.1 Teste de sensibilidade a suco gástrico artificial

Cinquenta e duas culturas foram testadas quanto à sensibilidade ao suco gástrico artificial e dessas, trinta e três (63%) foram classificadas como resistentes (% inibição <40%); onze (22%) como tolerantes ($60\% \geq \% \text{inibição} \geq 40\%$) e oito (15%) como sensíveis (% inibição > 60%). A porcentagem de inibição para cada amostra isolada está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de inibição de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir no teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial

Isolado	%Inibição	Isolado	%Inibição	Isolado	%Inibição
22P2	4,53	8P	52,67	18P	1,46
23P	19,72	8P2	36,01	19P	9,21
23P3	33,75	8P3	58,47	19U	10,56
24P3I	52,82	9P2	41,32	20U	52,70
25P	28,87	10P	5,38	20U1	35,20
1P	0,00	10P2	17,37	20U2	76,42
1P3	18,71	11P	41,06	21U1	53,06
2P2	48,48	11P3	36,35	21U2	8,81
2P3	19,31	12P	12,13	22U	52,71
3P2	59,55	13P2	3,92	1Z	0,00
3P3	22,69	13P3	0,00	15U	5,41
4P2I	97,33	14P	68,50	15U1	12,38
4P3I	73,86	14P2	12,31	15U2	7,84
4P3II	96,67	16P	90,39	16U	100,00
6P	36,99	16P3	16,39	17U	14,15
3U2	33,41	17P	23,86	18U	100,00
8U	19,75	17P2	25,21		
13P	100,00	11P2	100,00		

Os microrganismos foram classificados como: sensíveis (% inibição >60%), tolerantes (60%≥ %inibição ≥40%) e resistentes (%inibição <40%).

5.1.2 Teste de sensibilidade aos sais biliares

Quanto à sensibilidade aos sais biliares duas amostras (4%) foram classificadas como resistentes (% inibição <40%); treze (25%) como tolerantes (60%≥ % inibição ≥40%) e trinta e sete (71%) como sensíveis (% inibição > 60%). A porcentagem de inibição para cada amostra isolada está mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem de inibição de *Lactobacillus* spp. . isolados de grãos de kefir no teste de sensibilidade aos sais biliares

Isolado	%Inibição	Isolado	%Inibição	Isolado	%Inibição
22P2	84,30	8P	56,64	18P	93,17
23P	84,07	8P2	44,63	19P	100,00
23P3	61,22	8P3	61,79	19U	64,55
24P3I	63,99	9P2	51,82	20U	61,63
25P	60,01	10P	89,48	20U1	58,85
1P	100,00	10P2	93,89	20U2	47,36
1P3	100,00	11P	100,00	21U1	49,27
2P2	100,00	11P3	61,63	21U2	60,58
2P3	100,00	12P	58,84	22U	59,80
3P2	100,00	13P2	47,36	1Z	54,79
3P3	100,00	13P3	73,24	15U	72,03
4P2I	100,00	14P	66,02	15U1	94,73
4P3I	56,15	14P2	73,24	15U2	74,25

4P3II	82,40	16P	61,30	16U	69,98
6P	100,00	16P3	99,99	17U	3,42
3U2	100,00	17P	6,31	18U	70,76
8U	57,20	17P2	87,08		
13P	100,00	11P2	70,26		

Os microrganismos foram classificados como: sensíveis (% inibição >60%), tolerantes (60% \geq %inibição \geq 40%) e resistentes (%inibição <40%).

5.1.3 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados de lactobacilos foram resistentes à Vancomicina e Oxacilina; 75% e 70% resistentes a Gentamicina e Amicacina, respectivamente; menos de 15% foram moderadamente sensíveis ou resistentes a Ceftriaxona e Penicilina e, para os demais antimicrobianos, todas as amostras foram sensíveis. O perfil de susceptibilidade dos isolados de lactobacilos aos antimicrobianos testados está mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir

Código	TET	AMP	GEN	AMI	ERI	CRO	CLO	OXA	PEN	AMO	VAN
1P	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
1P3	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
1Z	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
20U1	S	S	R	R	S	S	S	R	MS	S	R
20U2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
21U1	S	S	R	R	S	MS	S	R	MS	S	R
21U2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
22P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
22U	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
23P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
23P3	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
24P3I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
25P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
20U	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
2P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
2P3	S	S	R	R	S	MS	S	R	S	S	R
3P2	S	S	R	R	S	S	S	R	MS	S	R
13P	S	S	R	R	S	MS	S	R	S	S	R
13P2	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
13P3	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
14P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
14P2	S	S	S	S	S	S	S	R	MS	S	R
15U	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
15U1	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
15U2	S	S	S	S	S	MS	S	R	S	S	R
16P	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R

16P3	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
16U	S	S	R	R	S	MS	S	R	S	S	R
3P3	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
3U2	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
4P2I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
4P3I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
4P3II	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
6P	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
8P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
8P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
8P3	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
8U	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
9P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
10P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
10P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
11P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
11P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
11P3	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
12P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
17P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
17P2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
17U	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
18P	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
18U	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
19P	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
19U	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R

Legenda: TET (tetraciclina 30µg), AMP (ampicilina 10µg), GEN (gentamicina 10 µg), AMI (amicacina 30 µg), ERI (eritromicina 15 µg), CRO (ceftriaxona 30 µg), CLO (cloranfenicol 30 µg), OXA (oxacilina 1 µg), PEN (penicilina G 10U), AMO (amoxicilina 10 µg), VAN (vancomicina 30 µg).

As amostras foram classificadas como S (sensível), MS (moderadamente sensível) e R (resistente)

5.1.4 Teste de antagonismo *in vitro*

A atividade antagonista *in vitro* foi avaliada pela produção de substâncias antagonistas difusíveis contra seis bactérias patogênicas reveladoras. Cerca de 85% das amostras de lactobacilos (denominadas produtoras) exibiram atividade antagonista contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* e, em torno de 65% exibiram atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*. O tamanho médio dos halos de inibição para cada amostra produtora está mostrado na Tabela 5 e o tamanho médio dos halos de inibição para cada bactéria reveladora está mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Médias dos halos de inibição (mm) de *Lactobacillus* spp. . isolados de grãos de kefir (amostras produtoras) contra bactérias patogênicas (reveladoras)

Produtoras	Bactérias reveladoras					
	P.A	L.M	S.A	S.T	E.C	E.F
1P	15,32	22,92	18,92	15,09	15,42	16,12
1P3	20,98	18,03	15,59	16,85	13,90	14,84
1Z	13	17,05	16,83	20,14	24,83	15,91
20U1	0	0	19,09	19,61	17,54	15,34
20U2	19,59	21,75	20,86	16,05	15,62	18,51
21U1	19,74	12,65	22,42	0	16,21	15,13
21U2	14,89	18,11	22,91	19,22	13,34	18,69
22P2	19,71	0	0	16,81	22,82	0
22U	23,71	16,81	21,46	19,00	19,68	0
23P	19,22	15,61	19,81	14,20	16,48	20,43
23P3	16,32	15,60	20,05	16,89	0	18,39
24P3I	12,67	14,81	15,91	13,89	18,95	17,36
25P	15,49	20,67	14,94	18,80	14,83	15,05
20U	18,33	16,36	16,32	15,76	13,35	17,43
2P2	17,34	10,40	9,50	25,38	12,22	12,22
2P3	17,94	14,16	15,27	22,99	10,17	13,90
3P2	19,62	0	16,56	27,41	15,86	17,99
13P	22,80	16,41	16,28	25,71	17,48	0
13P2	16,17	20,13	14,78	24,23	14,87	0
13P3	21,68	14,27	17,12	21,64	9,88	0
14P	15,62	15,28	14,79	22,08	14,37	0
14P2	19,79	16,37	17,89	24,34	12,46	0
15U	12,34	19,09	14,49	20,21	0	18,81
15U1	0	16,76	0	0	15,37	17,10
15U2	9,17	20,04	13,08	16,58	28,22	15,36
16P	12,11	20,36	12,79	27,33	11,39	24,59
16P3	9,33	18,09	14,16	19,24	11,39	17,93
16U	21,87	25,93	21,85	24,53	29,57	21,10
3P3	22,49	14,86	24,17	25,90	18,25	13,80
3U2	22,54	14,77	21,05	26,31	17,34	16,91
4P2I	0	0	0	0	0	0
4P3I	0	0	0	14,49	20,63	0
4P3II	0	0	0	0	0	0
6P	17,68	0	19,44	0	22,45	0
8P	20,02	0	13,06	20,61	30,98	15,86
8P2	19,83	0	16,08	13,04	29,06	20,06
8P3	18,02	19,44	18,53	20,24	16,94	0
8U	18,00	13,39	20,51	27,48	20,15	23,06
9P2	23,08	19,06	20,14	29,79	16,38	21,11
10P	25,24	16,91	17,10	27,18	20,45	21,03
10P2	17,36	17,36	21,47	27,75	20,62	27,11
11P	21,88	0	14,69	25,42	19,76	19,12
11P2	0	15,01	0	0	16,10	0
11P3	0	0	18,20	21,82	16,90	18,95
12P	20,86	0	15,90	20,96	18,19	10,55
17P	16,32	15,85	0	0	0	0

17P2	24,31	15,37	14,98	20,46	20,99	0
17U	19,89	12,57	21,41	17,47	21,82	17,86
18P	21,92	18,69	19,51	19,56	20,76	12,63
18U	17,19	0	20,09	18,63	15,93	13,56
19P	23,71	13,01	19,21	18,88	19,28	14,53
19U	24,06	0	17,48	19,23	17,67	13,32

Legenda: P..A = *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), L.M = *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), S.A = *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), S.T = *Salmonella Typhimurium*(ATCC 14028), E.C = *Escherichia coli* (ATCC 25723), E.F = *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

5.1.5 Teste de hidrofobicidade de superfície celular

A análise de hidrofobicidade da superfície celular revelou que 67% dos lactobacilos foram hidrofóbicos (MATS>66%); 31% moderadamente hidrofóbicos ($33\% \leq \text{MATS} \leq 66\%$) e apenas uma única linhagem apresentou superfície celular hidrofílica (MATS<33%). Esses resultados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Porcentagem de Adesão Microbiana a Solventes (MATS) de *Lactobacillus* spp. . isolados de grãos de kefir

Isolado	%MATS	Isolado	%MATS	Isolado	%MATS
22P2	82,97	8P	66,40	18P	58,89
23P	48,21	8P2	67,45	19P	49,19
23P3	62,72	8P3	80,41	19U	50,58
24P3I	58,78	9P2	74,46	20U	78,21
25P	58,69	10P	49,56	20U1	18,21
1P	62,67	10P2	55,35	20U2	58,23
1P3	60,32	11P	56,62	21U1	57,77
2P2	43,70	11P3	51,82	21U2	67,16
2P3	53,47	12P	46,21	22U	52,25
3P2	48,01	13P2	47,53	1Z	53,08
3P3	83,20	13P3	53,21	15U	56,75
4P2I	98,13	14P	63,71	15U1	52,52
4P3I	86,51	14P2	62,13	15U2	67,69
4P3II	94,97	16P	60,70	16U	64,87
6P	78,54	16P3	53,31	17U	46,67
3U2	36,91	17P	53,31	18U	57,85
8U	76,69	17P2	57,41		
13P	43,97	11P2	68,36		

Os microrganismos foram classificados como: hidrofóbicos (MATS>66%); moderadamente hidrofóbicos ($33\% \leq \text{MATS} \leq 66\%$) ou hidrofílicos (MATS<33%)

5.2 Preservação de *Lactobacillus* spp. selecionados pelos testes de caracterização probiótica *in vitro*

5.2.1 Avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus* spp. após liofilização e estocagem

A análise dos resultados de avaliação da sobrevivência para *L. casei* 17U-A e 25P-L (Figura 1 e Figura 2, respectivamente) mostraram que após um mês de armazenamento a 10°C houve um decréscimo de três e quatro ciclos log, respectivamente, quando nenhum crioprotetor foi utilizado (NaCl 0,9%; controle). Para o isolado 17U-A, a adição de alginato de sódio 0,5% não impediu a perda de viabilidade do microrganismo após 14 dias de armazenamento, visto que as curvas do controle e desse crioprotetor praticamente se sobrepõem após este período. No entanto, para este isolado o uso de trealose, sacarose ou leite desnatado levou a uma perda de viabilidade inferior a dois ciclos log, sendo o primeiro o crioprotetor mais eficiente, pois garantiu um decréscimo de menos de um ciclo log. Para a linhagem 25P-L, o decréscimo de apenas um ciclo log foi observado com o uso de leite desnatado, sacarose ou trealose. De maneira geral, as linhagens de *L. casei* apresentaram um número de células viáveis superior a 10^8 UFC/g de formulação após o processo de liofilização e esse número se manteve estável ao longo do período de estocagem, independente do crioprotetor utilizado.

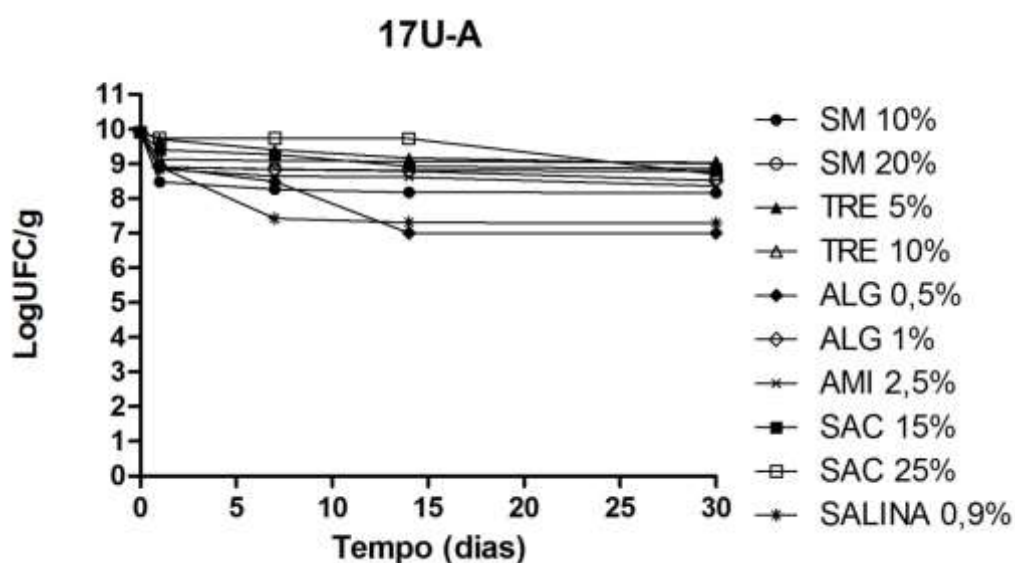


Figura 1. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus casei* 17U-A antes (T0), logo após a liofilização (T1) e nos tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 2,5% (amido 2,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

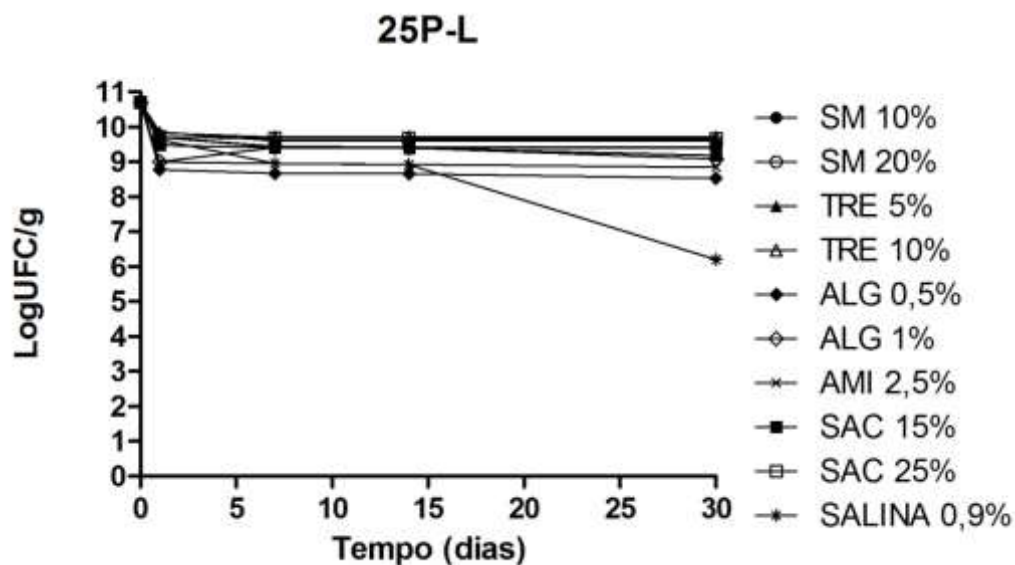


Figura 2. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus casei* 25P-L antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 2,5% (amido 2,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Em relação aos isolados *L. perolens* 11P3-A e 17P2-A (Figura 3 e Figura 4, respectivamente), houve uma diminuição de quatro e cinco ciclos log, respectivamente, quando nenhum crioprotetor foi utilizado e o mesmo foi observado nas formulações com amido para a amostra 11P3-A. Houve decréscimo de dois ciclos log nas formulações com sacarose ou alginato de sódio, enquanto naquelas com leite desnatado ou trealose foram observados decréscimo de apenas um ciclo log na viabilidade de ambas as linhagens. As linhagens de *L. perolens*, assim como as de *L. casei*, apresentaram queda na viabilidade celular mais expressiva durante o processo de liofilização do que ao longo do período de estocagem.

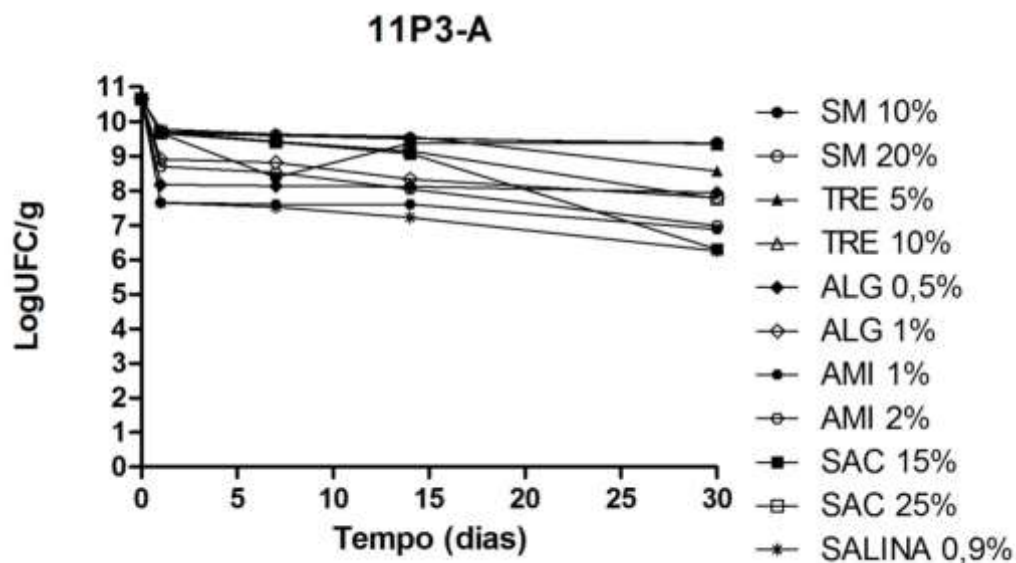


Figura 3. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus perolens* 11P3-A antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos (T, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

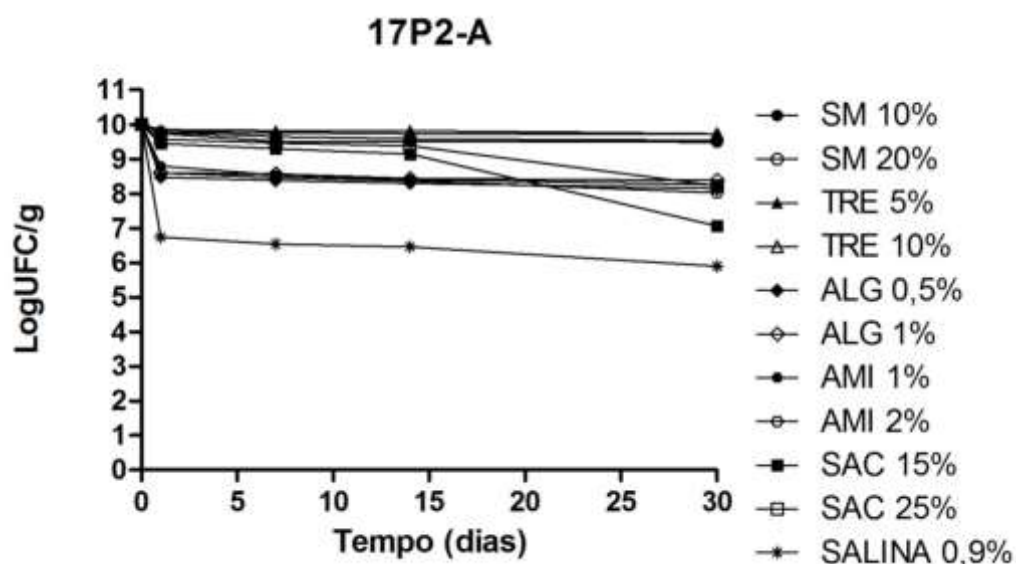


Figura 4. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus perolens* 17P2-A antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Quanto à viabilidade de *L. satsumensis* 23P3-L (Figura 5), foi observado um decréscimo de dois ciclos log quando nenhum crioprotetor foi utilizado e o mesmo foi constatado para as formulações com amido e alginato de sódio. Houve um declínio de um ciclo log nas formulações com leite desnatado e de menos de um ciclo naquelas com trealose ou sacarose. A linhagem *L. satsumensis* 18P-A (Figura 6) apresentou perda de viabilidade inferior a um ciclo log durante o processo de liofilização e ao longo da estocagem, mesmo na ausência de crioprotetor e, entre esses, sacarose e trealose se destacaram no efeito protetor, uma vez que na presença dos mesmos os decréscimos foram ainda menores no número de células viáveis.

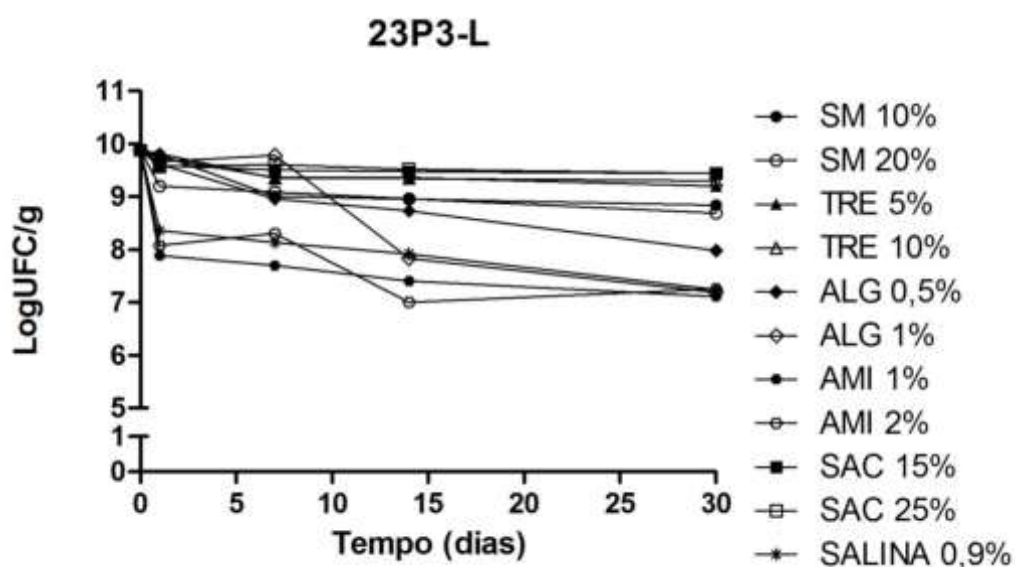


Figura 5. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus satsumensis* 23P3-L antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

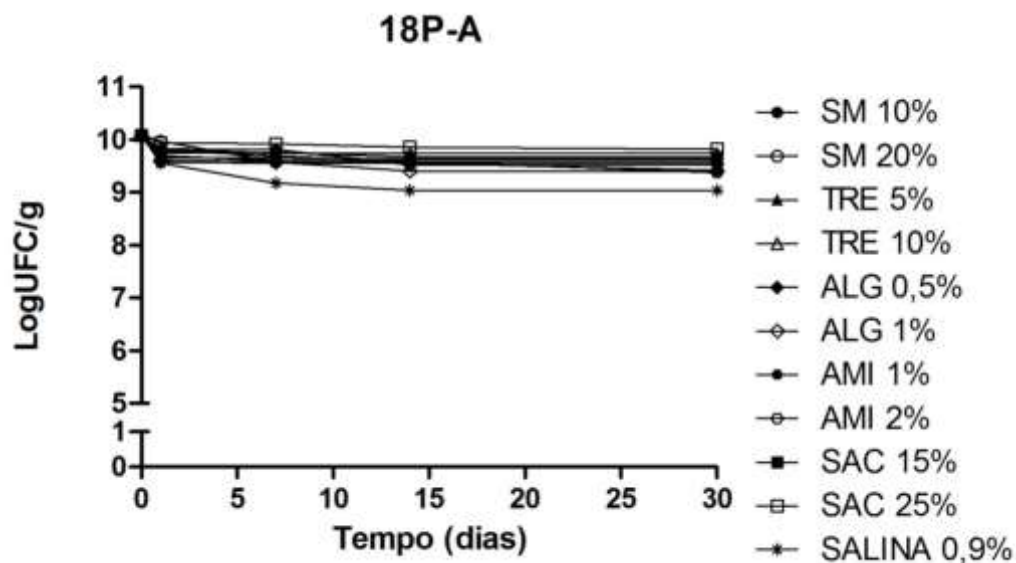


Figura 6. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos T7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Em relação ao isolado *L. mali* 21U2-A (Figura 7), houve um declínio no número de células viáveis de aproximadamente nove ciclos log na ausência de crioprotetor. Na formulação com alginato de sódio ou amido houve decréscimo de quatro ciclos log e naquelas com leite desnatado, trealose ou sacarose, a diminuição foi de apenas um ciclo log após um mês de armazenamento. Para esta linhagem, a perda de viabilidade devido à liofilização foi de, no máximo, um ciclo log. Quedas maiores foram observadas durante o período de estocagem, dependendo do crioprotetor utilizado.

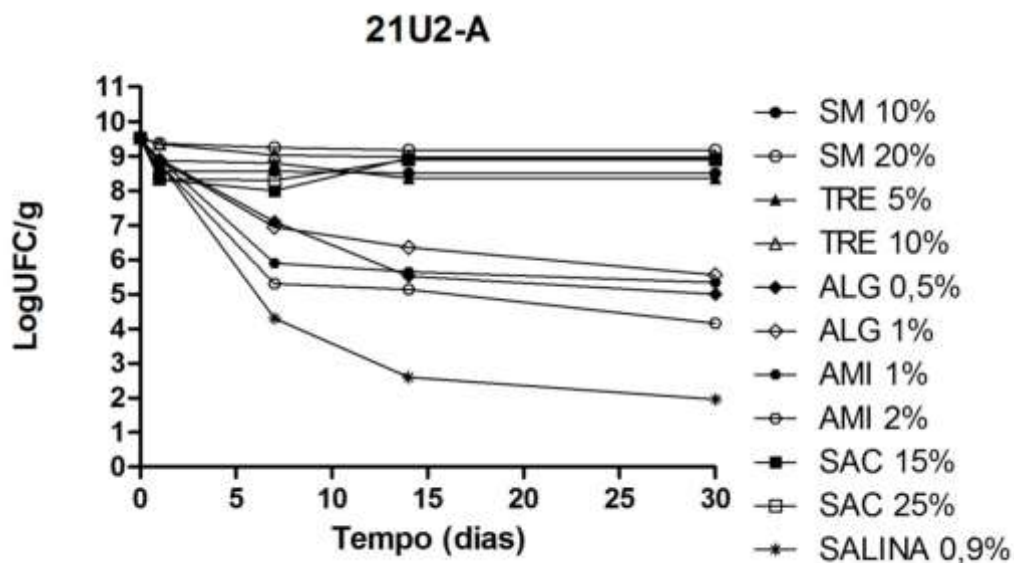


Figura7. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus mali* 21U2-A antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Quanto à viabilidade de *L. kefir* 24P3I-L (Figura 8), logo após a liofilização houve decréscimo de quatro ciclos log na ausência de crioprotetor, de três ciclos log nas formulações com alginato de sódio ou amido, de dois ciclos log naquelas com sacarose ou trealose e de apenas um ciclo log quando leite desnatado foi utilizado como crioprotetor. De maneira geral, houve apenas um pequeno declínio no número de células viáveis ao longo do restante do período de estocagem para todos os crioprotetores utilizados.

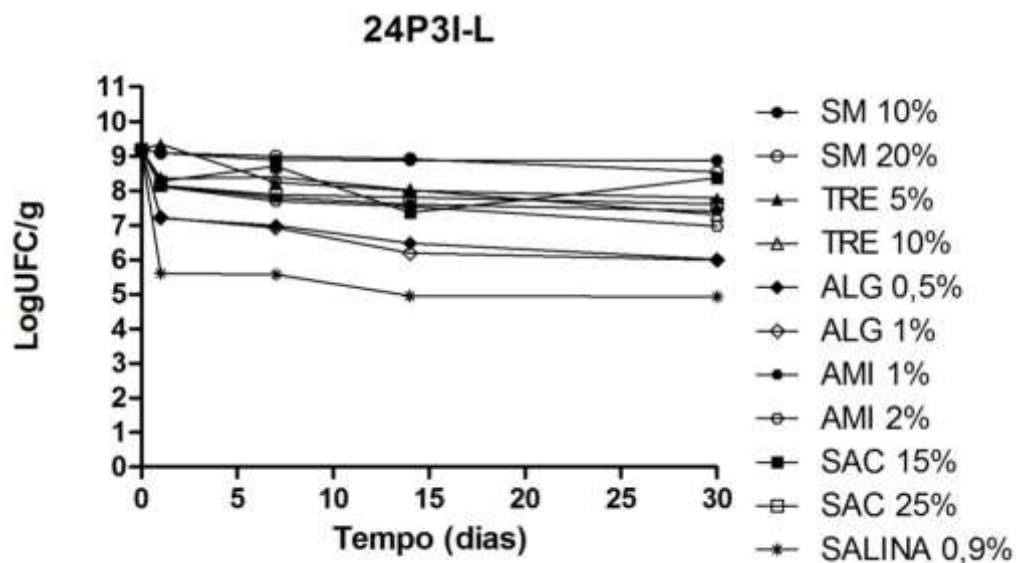


Figura 8. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus kefir* 24P3I-L antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos T7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); ALG 0,5, 1% (alginato de sódio 0,5, 1% p/v); AMI 1, 2% (amido 1, 1,5% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

L. kefiranofaciens 8U-L (Figura 9), após 30 dias sob refrigeração, reduziu em quatro ciclos log seu número de células viáveis na ausência de crioprotetor e de um ciclo log nas formulações com os demais crioprotetores. A viabilidade de *L. diolivorans* 1Z-A (Figura 10), apresentou declínio de apenas um ciclo log após um mês de armazenamento, mesmo na ausência do crioprotetor.

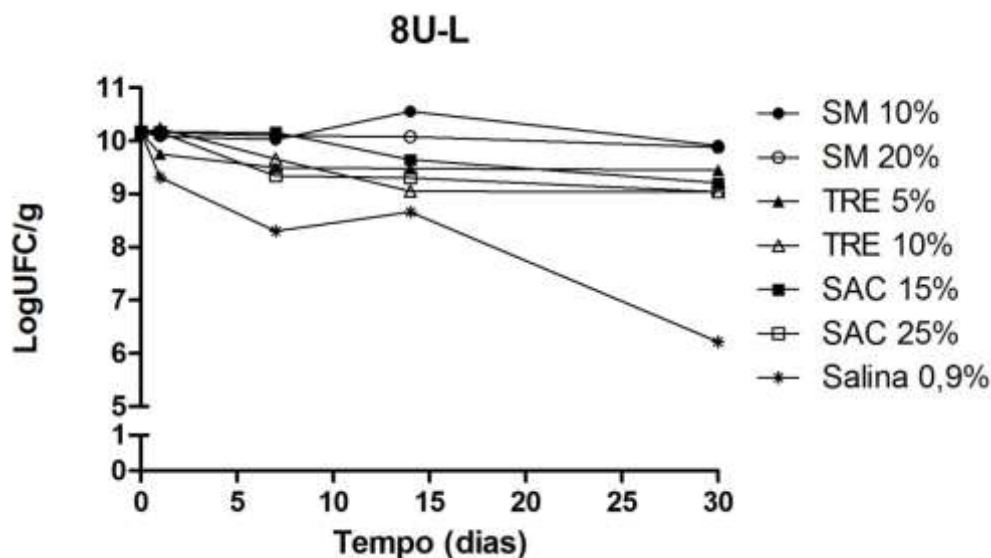


Figura 9. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus kefiranofaciens* 8U-L antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

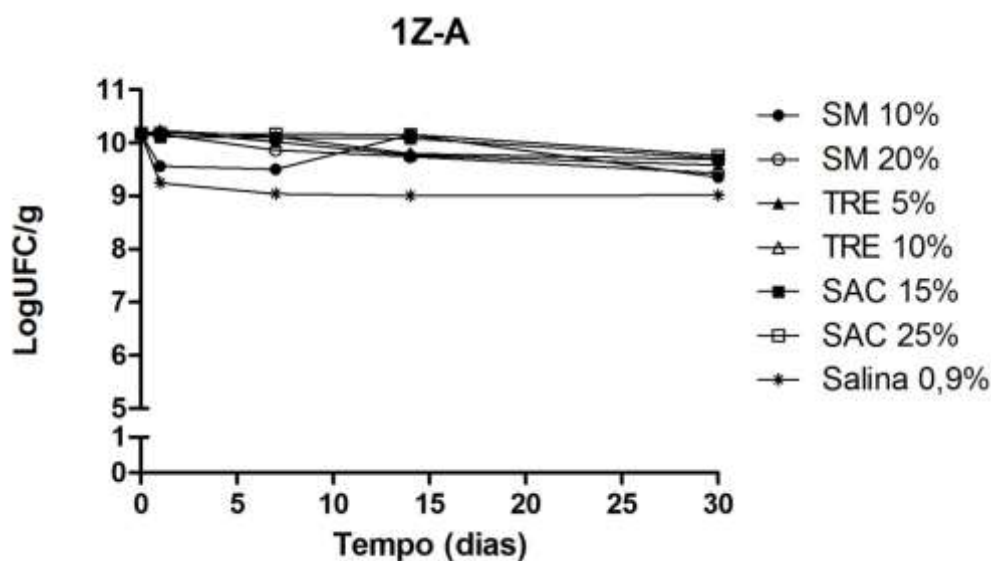


Figura 10. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus diolivorans* (1Z-A) antes (T0), logo após a liofilização (T1) e no tempos 7, 14 e 30 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10, 20% (leite desnatado 10, 20% p/v); TRE 5, 10% (trealose 5, 10% p/v); SAC 15, 25% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

De acordo com FRY (1966), os microrganismos podem ser classificados em três grupos com base na porcentagem de sobrevivência após a liofilização: estáveis (% sobrevivência > 70%); média estabilidade (entre 30 e 70%) e sensíveis (% sobrevivência < 30%). Baseando-se nestes critérios, todos os isolados foram estáveis, mesmo após um mês de armazenamento, quando liofilizadas com leite desnatado, trealose ou sacarose (em ambas as concentrações testadas de cada crioprotetor). Amido e alginato de sódio, de uma forma geral, foram associados a uma menor proteção, com taxas de sobrevivência próximas às do controle (NaCl 0,9% p/v) para a maior parte dos isolados. Na ausência do crioprotetor, os isolados 17U-A, 18P-A, 23P3-L e 1Z permaneceram estáveis. Os percentuais de sobrevivência para cada isolado está apresentado nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

Tabela 7: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus casei* 17U-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	85,62	82,41
SM 20%	89,91	88,71
TRE 5%	97,97	90,88
TRE10%	92,16	91,26
ALG 0,5%	89,90	72,68
ALG 1%	89,93	85,97
Amido 2,5%	89,32	84,36
SAC 15%	94,90	89,38
SAC 25%	98,36	87,75
NaCl 0,9%	89,90	73,64

Tabela 8: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus casei* 25P-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	90,67	87,89
SM 20%	90,69	88,00
TRE 5%	92,06	89,75
TRE10%	91,78	90,65
ALG 0,5%	82,05	79,74
ALG 1%	84,12	84,86
Amido 2,5%	84,12	82,61
SAC 15%	88,58	85,85
SAC 25%	90,65	90,15
NaCl 0,9%	90,04	57,96

Tabela 9: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus perolens* 11P3-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	90,61	88,00
SM 20%	90,70	87,95
TRE 5%	91,79	80,41
TRE10%	91,04	87,75
ALG 0,5%	76,75	74,55
ALG 1%	83,57	73,21
Amido 1%	71,84	64,54
Amido 2%	81,66	65,50
SAC 15%	90,61	59,15
SAC 25%	91,04	72,91
NaCl 0,9%	71,84	58,72

Tabela10: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus perolens* 17P2-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	97,36	94,94
SM 20%	97,80	95,38
TRE 5%	98,45	97,29
TRE10%	97,78	97,29
ALG 0,5%	84,77	81,49
ALG 1%	86,02	83,80
Amido 1%	87,93	82,67
Amido 2%	86,02	80,29
SAC 15%	94,47	70,61
SAC 25%	95,74	82,30
NaCl 0,9%	67,40	59,03

Tabela11: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus satsumensis* 23P3-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1 (% Sobrevivência)	T30 (%Sobrevivência)
SM 10%	99,13	89,45
SM 20%	93,10	87,95
TRE 5%	98,59	93,10
TRE10%	99,33	94,13
ALG 0,5%	97,29	74,79
ALG 1%	97,79	74,74
Amido 1%	79,82	75,10
Amido 2%	81,77	75,43
SAC 15%	97,07	95,58
SAC 25%	96,89	95,56
NaCl 0,9%	84,63	73,30

Tabela12: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A, logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1 (% Sobrevivência)	T30 (%Sobrevivência)
SM 10%	97,22	95,10
SM 20%	98,93	94,93
TRE 5%	95,81	95,50
TRE10%	97,41	96,59
ALG 0,5%	97,41	94,45
ALG 1%	95,31	93,33
Amido 1%	94,95	93,46
Amido 2%	96,23	93,01
SAC 15%	96,76	95,92
SAC 25%	98,60	97,44
NaCl 0,9%	94,81	89,66

Tabela 13: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus mali* 21U2-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	90,02	89,32
SM 20%	98,35	96,37
TRE 5%	93,18	87,81
TRE10%	98,15	94,22
ALG 0,5%	93,56	52,57
ALG 1%	93,27	58,37
Amido 1%	93,56	56,13
Amido 2%	92,33	43,72
SAC 15%	87,43	93,81
SAC 25%	87,54	93,48
NaCl 0,9%	92,62	20,53

Tabela 14: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus kefir* 24P3I-L logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1	T30
	(% Sobrevivência)	(%Sobrevivência)
SM 10%	98,87	96,60
SM 20%	98,91	92,90
TRE 5%	100,00	84,77
TRE10%	90,82	79,44
ALG 0,5%	78,39	65,33
ALG 1%	78,50	65,21
Amido 1%	88,64	80,61
Amido 2%	88,29	75,82
SAC 15%	89,98	91,05
SAC 25%	88,64	82,72
NaCl 0,9%	60,96	53,58

Tabela 15: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus kefiranofaciens* 8U-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1 (% Sobrevivência)	T30 (%Sobrevivência)
SM 10%	99,23	97,54
SM 20%	99,94	97,21
TRE 5%	95,93	93,00
TRE10%	100,63	88,98
SAC 15%	100,00	90,61
SAC 25%	99,97	88,98
NaCl 0,9%	91,62	61,19

Tabela 16: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus diolivorans* 1Z-A logo após a liofilização (T1) e com 30 dias de armazenamento (T30)

Formulações	T1 (% Sobrevivência)	T30 (%Sobrevivência)
SM 10%	93,97	91,88
SM 20%	99,86	92,67
TRE 5%	100,00	94,12
TRE10%	100,00	95,20
SAC 15%	99,39	95,40
SAC 25%	100,00	95,93
NaCl 0,9%	90,81	88,57

A avaliação da sobrevivência após liofilização de *L. satsumensis* 18P-A por 180 dias mostrou perda de viabilidade inferior a um ciclo log durante a liofilização e, ao longo de todo o tempo de estocagem (Figura 11), o mesmo efeito foi observado. Na ausência do crioprotetor, a perda foi apenas de um ciclo log ao final de 180 dias e em termos de percentual de sobrevivência ficou próximo dos 90% (Tabela 17). A adição de sacarose, trealose ou leite desnatado elevou este percentual para 94%. Para *L. satsumensis* 23P3-L, independentemente do crioprotetor utilizado, a viabilidade caiu cerca de dois ciclos log ao final de 180 dias sendo que na formulação controle a queda chegou próximo de quatro ciclos log (Figura 12) e, em termos de percentual de sobrevivência, 62% (Tabela 18). A adição dos crioprotetores elevou este percentual para valores superiores a 80%.

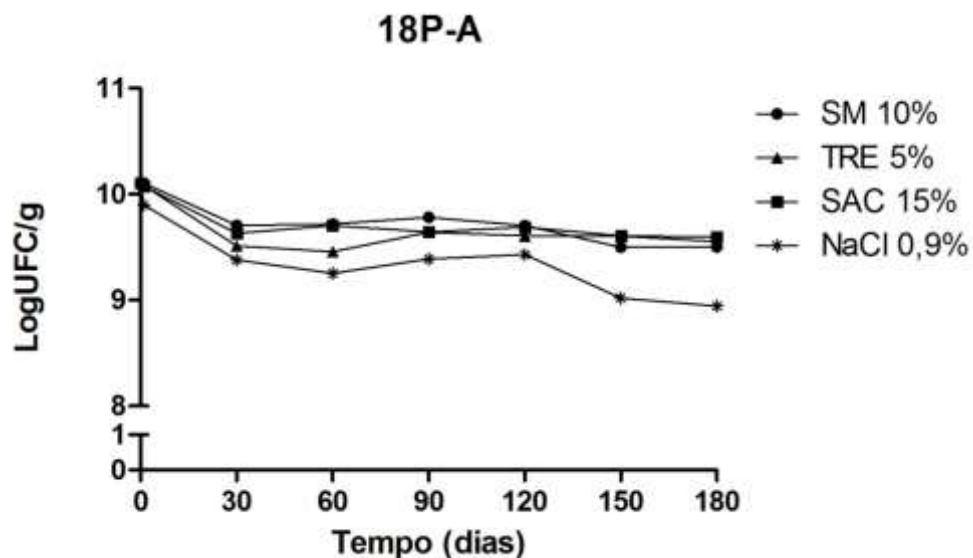


Figura 11. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus satsumensis* (18P-A) antes (T0) e nos tempos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10% (leite desnatado 10% p/v); TRE 5% (trealose 5, 10% p/v); SAC 15% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Tabela 17: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A logo após a liofilização (T1) e com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento a 10°C

Tempo (dias)	Formulações			
	SAC 15%	TRE 5%	SM 10%	NaCl 0,9%
T1	99,71	99,79	100,00	97,98
T30	95,33	94,14	96,07	92,83
T60	96,05	93,62	96,18	91,57
T90	95,45	95,43	96,82	92,90
T120	95,90	95,08	96,03	93,34
T150	95,08	95,06	94,03	89,28
T180	94,96	94,55	94,06	88,53

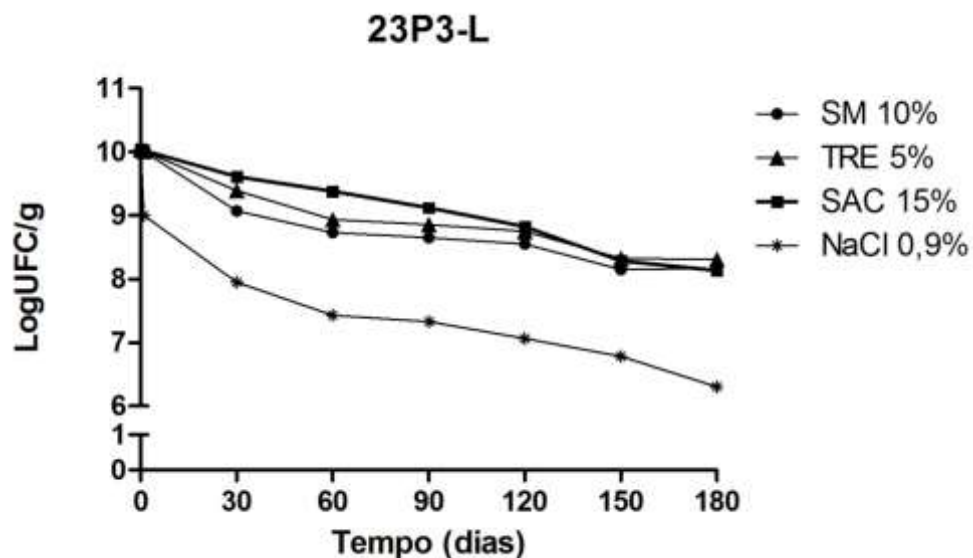


Figura 12. Contagem de células viáveis (log UFC/g) de *Lactobacillus satsumensis* (23P3-L) antes (T0) e nos tempos (T30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) sob refrigeração a 10°C em diferentes formulações contendo crioprotetores: SM 10% (leite desnatado 10% p/v); TRE 5% (trealose 5, 10% p/v); SAC 15% (sacarose 15, 25% p/v) e em salina 0,9% (NaCl 0,9% p/v, controle). As contagens foram feitas em duplicata.

Tabela 18: Efeito dos crioprotetores na porcentagem de sobrevivência de *Lactobacillus satsumensis* 23P3-L logo após a liofilização (T1) e com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento

Tempo (dias)	Formulações			
	SAC 15%	TRE 5%	SM 10%	NaCl 0,9%
T1	99,79	99,71	99,67	89,62
T30	95,73	93,50	90,30	79,19
T60	93,43	88,97	86,96	74,00
T90	90,82	88,20	86,15	72,99
T120	87,88	87,15	85,12	70,34
T150	82,51	82,90	81,18	67,57
T180	80,98	82,75	81,28	62,76

5.2.2 Capacidade de reativação *in vitro*

L. casei 25P-L (Figura 13) nas formulações com sacarose 25% e trealose 5% (p/v) apresentaram os menores tempos de fase lag e bom rendimento de biomassa (a absorbância após 18 horas de incubação alcançou valores bem próximos ao da amostra antes da liofilização), mesmo após o armazenamento a 10°C por 30 dias. Na ausência de crioprotetor, não houve crescimento microbiano após 30 dias de armazenamento.

L. casei 17U-A (Figura 14) apresentou crescimento similar à linhagem 25P-L nas formulações com os crioprotetores sacarose e trealose logo após a liofilização (T1). No entanto, o armazenamento por 30 dias afetou de maneira drástica tanto o tempo de fase lag, como o rendimento, já que só foi observado um discreto crescimento microbiano após 10 horas de incubação na formulação com sacarose 15% p/v.

L. perolens 11P3-A (Figura 15) e *L. perolens* 17P2-A (Figura 16) apresentaram os melhores resultados nas formulações com leite desnatado e trealose (nas duas concentrações testadas). Mesmo na presença desses crioprotetores, houve um extenso prolongamento da fase lag após o armazenamento. Porém, nessas formulações, o rendimento após 18 horas de incubação foi bem próximo ao da amostra antes da liofilização. Na ausência de crioprotetor, não houve crescimento microbiano nem mesmo nas amostras recém-liofilizadas (T1).

Antes da liofilização, *L. mali* 21U2-A (Figura 17) e *L. kefir* 24P3I-L (Figura 18) apresentaram pouco crescimento (absorbância em torno de 1,0 e 0,6, respectivamente). Curiosamente, após o processo, a quantidade de biomassa acumulada (em termos de medida de absorbância) foi nitidamente superior nas formulações com leite desnatado e sacarose para *L. mali* e leite desnatado para *L. kefir*. Em ambas as linhagens, na ausência de crioprotetor, não houve crescimento microbiano nos tempos avaliados.

L. kefir 8U-L (Figura 19) apresentou os melhores resultados de reativação com sacarose 15 e trealose 10% p/v. Nessas formulações, a quantidade de biomassa acumulada (em termos de medida de absorbância) foi próxima àquela obtida pela amostra antes da liofilização. Nas demais formulações foi observado pequeno aumento de fase lag.

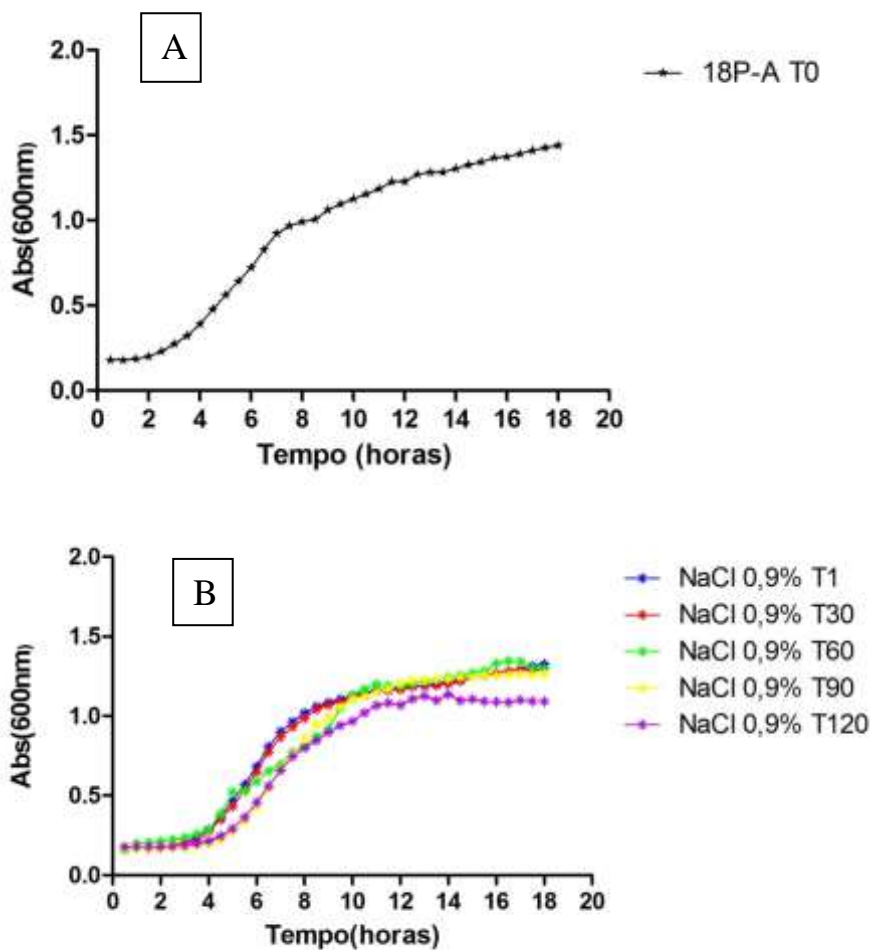
L. diolivorans 1Z-A (Figura 20) apresentou boa capacidade de reativação, mesmo na ausência de crioprotetores. O armazenamento diminuiu a quantidade de biomassa acumulada, principalmente na formulação controle (NaCl 0,9%) e leite desnatado (ambas as concentrações), mas não aumentou de modo expressivo o tempo de

fase lag. Trealose e sacarose preservaram melhor estes dois parâmetros, com destaque para as formulações sacarose que apresentaram resultados muito próximos ao da amostra antes da liofilização.

L. satsumensis 18P-A e *L. satsumensis* 23P3-L (Figura 21 e Figura 22, respectivamente) apresentaram os melhores resultados de reativação dentre todas as linhagens testadas. Mesmo na ausência do crioprotetor e após o armazenamento, houve crescimento microbiano com rendimento bem próximo ao da amostra antes da liofilização. As formulações com sacarose (ambas as concentrações) merecem destaque pela preservação extremamente próxima ao da amostra antes do processo, tanto em relação ao tempo de fase lag quanto ao rendimento em biomassa.

Após 120 dias, *L. satsumensis* 18P-A manteve a capacidade de reativação de maneira muito similar ao observado para a cultura antes da liofilização (T0), mesmo na ausência do crioprotetor (Figura 23). O armazenamento não afetou o tempo de fase lag e tampouco a quantidade de biomassa acumulada (em termos de medida de absorbância) que foi constatado pela sobreposição das curvas de reativação nos diferentes tempos de armazenamento. A capacidade de reativação de *L. satsumensis* 23P3-L, no entanto, foi afetada pelo armazenamento na formulação controle (NaCl 0,9% p/v), com leite desnatado e trealose nas quais foi observada progressiva diminuição da biomassa acumulada e aumento da fase lag, quando comparado à cultura fresca (Figura 24 A, B, D e E). A formulação com sacarose, no entanto, melhorou ambos os parâmetros e foi pouco afetada pelo armazenamento já que, após 120 dias, houve sobreposição das curvas de reativação (Figura 24 C).

(Continua)



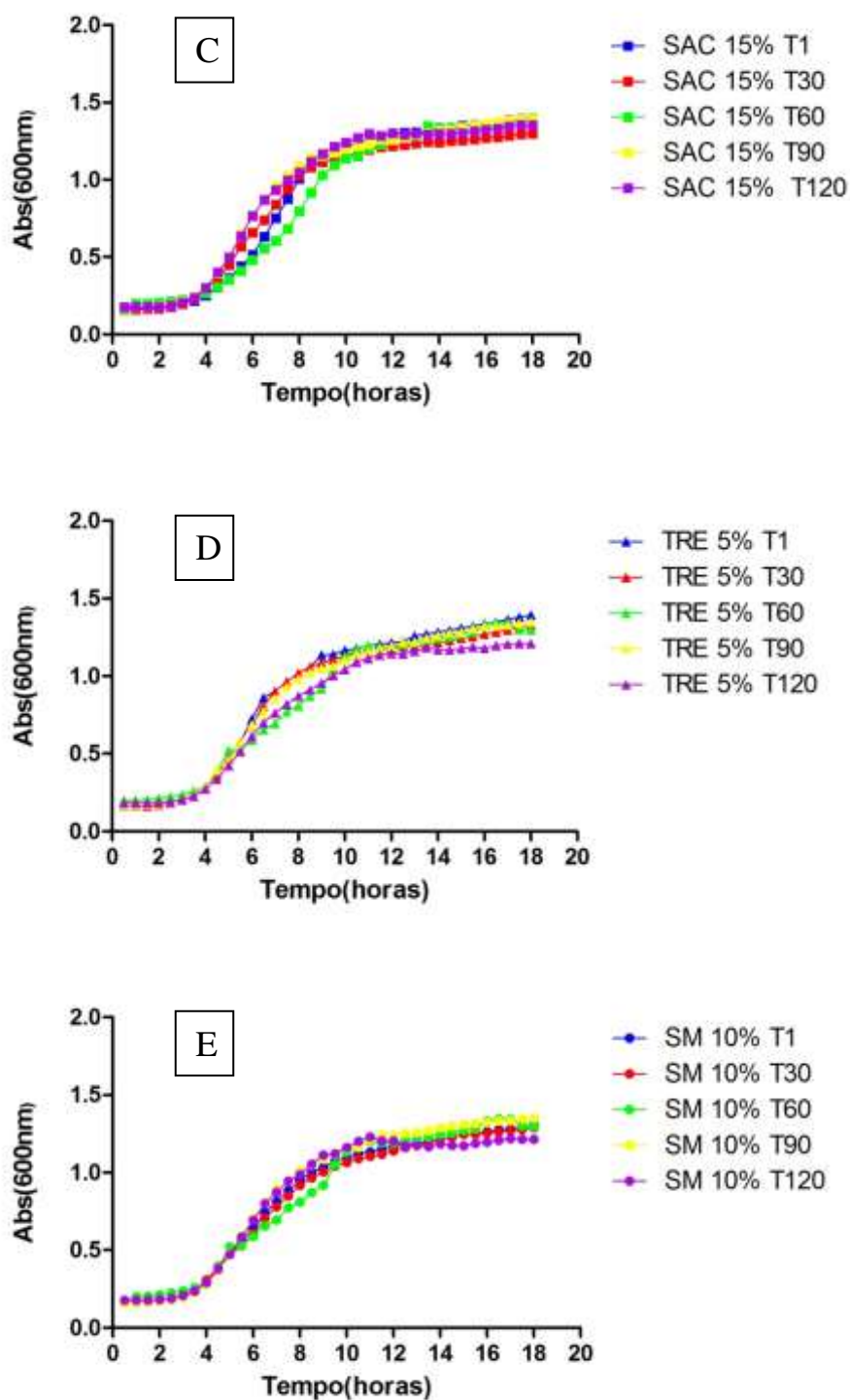
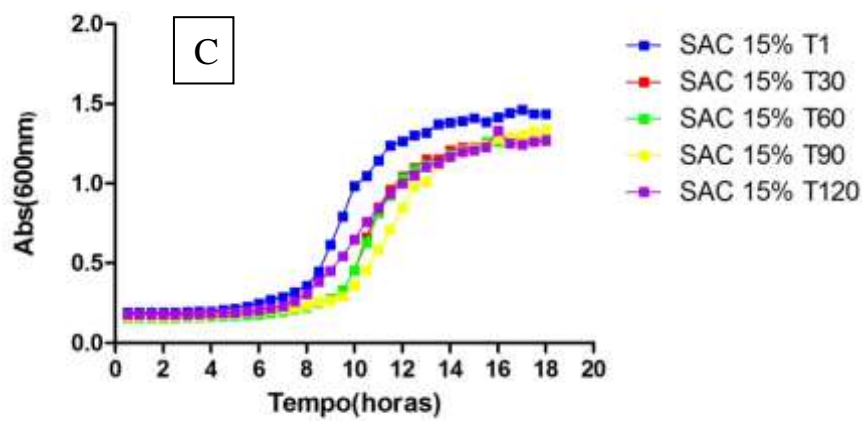
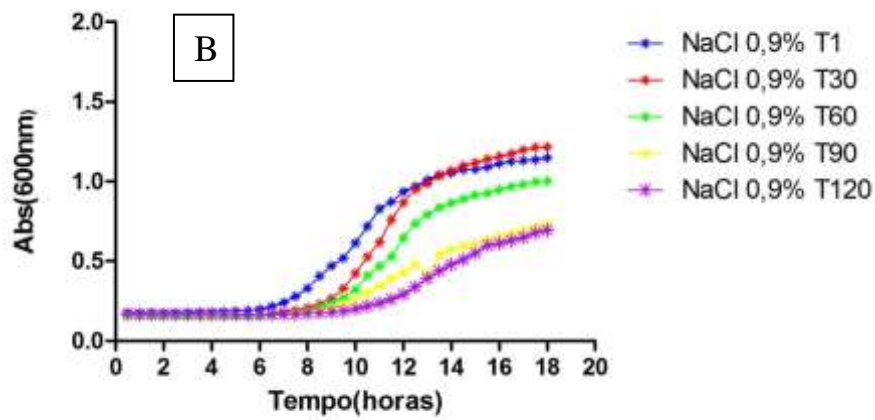
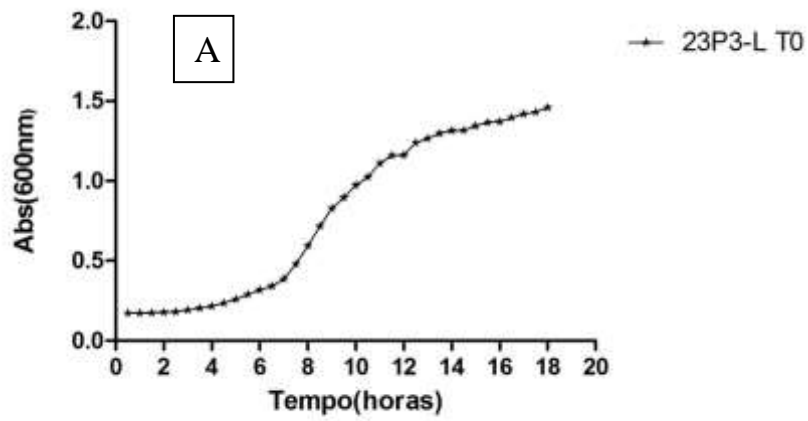


Figura 23. Cinética de reativação de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva preta (gráfico A) refere-se ao experimento realizado antes da liofilização (T0), curvas azuis, vermelhas, verdes, amarelas e lilás (gráficos B, C, D e E) referem-se ao experimento realizado nos tempos 1, 30, 60, 90 e 120 dias após liofilização em NaCl 0,9%(B), SAC 15%(C), TRE 5%(D), SM 10% (E). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,001 e 0,089.

(Continua)



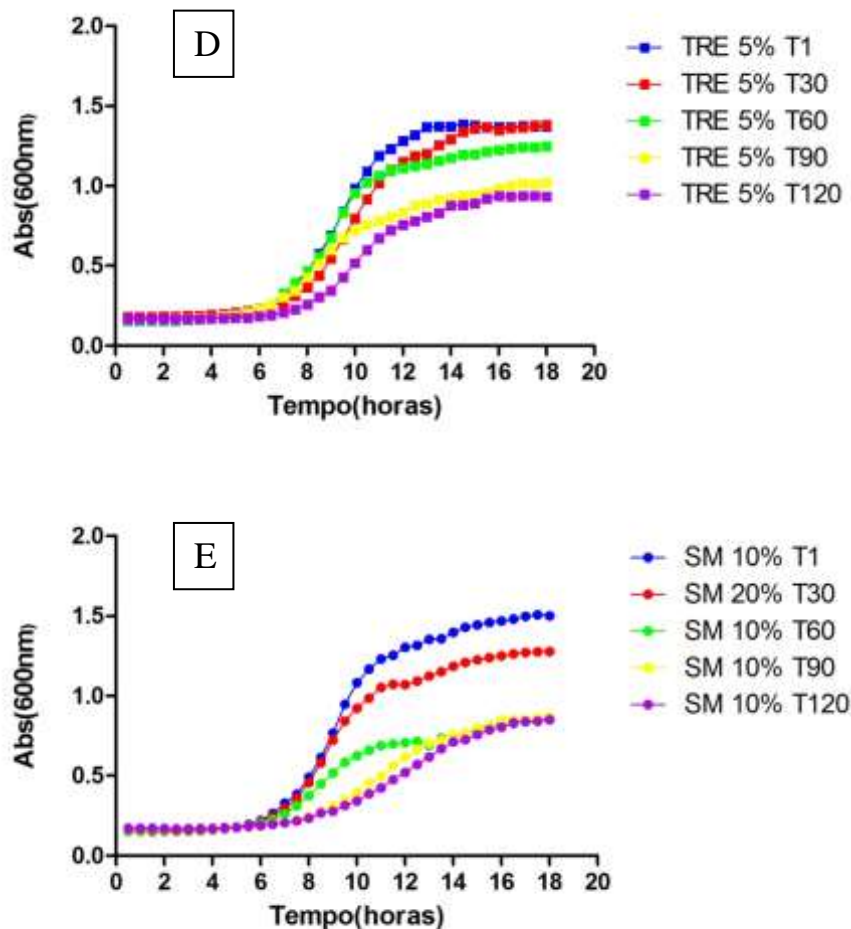


Figura 24. Cinética de reativação de *Lactobacillus satsumensis* 23P3-L em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva preta (gráfico A) refere-se ao experimento realizado antes da liofilização (T0), curvas azuis, vermelhas, verdes, amarelas e lilás (gráficos B, C, D e E) refere-se ao experimento realizado nos tempos 1, 30, 60, 90 e 120 dias após liofilização em NaCl 0,9%(B), SAC 15%(C), TRE 5%(D), SM 10% (E). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,001 e 0,104.

5.3 Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A

5.3.1 Teste de antagonismo *in vitro* contra bactérias patogênicas

A atividade antagonista *in vitro* foi avaliada pela produção de substâncias antagonistas difusíveis pela amostra *L. satsumensis* 18P-A liofilizada com sacarose 15% ou NaCl 0,9% p/v (controle) contra seis bactérias patogênicas reveladoras. A análise dos resultados (Figura 25) mostrou que a liofilização não interferiu na capacidade de

inibição do lactobacilo contra os patógenos testados, habilidade esta que já tinha sido verificada na cultura fresca. Além disso, o tamanho dos halos de inibição gerados a partir da amostra liofilizada com sacarose 15% como crioprotetor foram maiores que aqueles obtidos pela amostra liofilizada com NaCl 0,9% (controle). Na Figura 26, são mostrados os halos de inibição contra *S. Typhimurium* e *E. coli*.

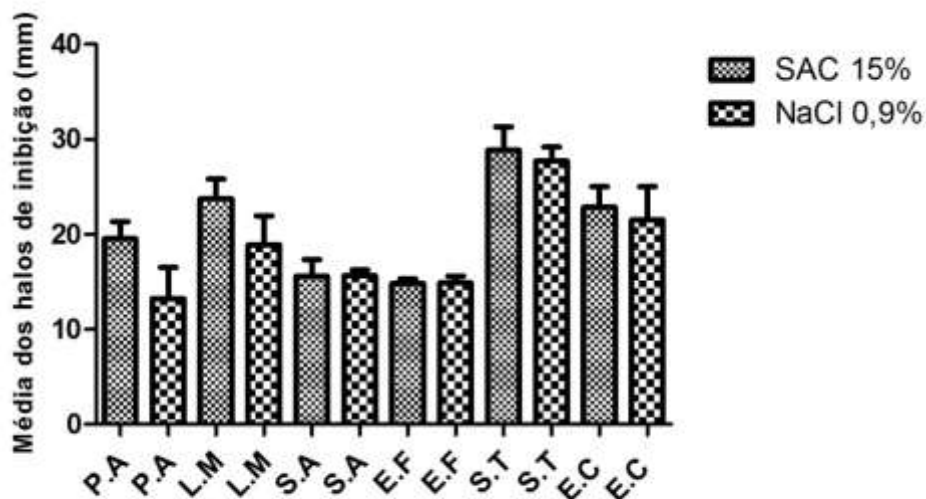


Figura 25. Médias dos halos de inibição (mm) de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A liofilizado em sacarose 15% ou NaCl 0,9% contra as bactérias reveladoras P.A (*Pseudomonas aeruginosa*), L.M (*Listeria monocytogenes*), S.A (*Staphylococcus aureus*), S.T (*Salmonella Typhimurium*), E.C (*Escherichia coli*), E.F (*Enterococcus faecalis*).

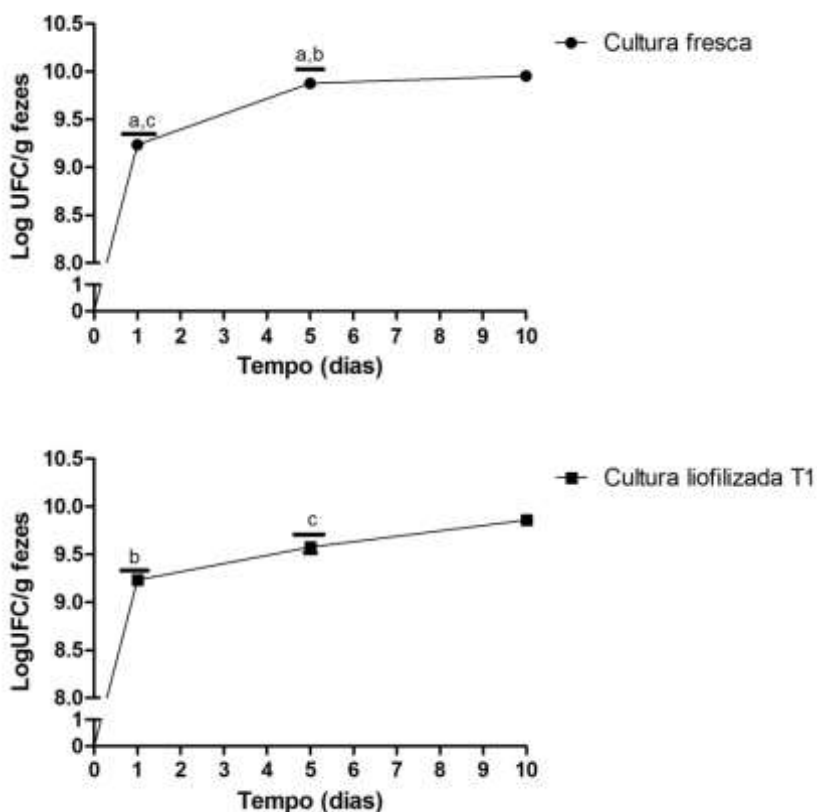


Figura 26: Halos de inibição de *L. satsumensis* 18P-A liofilizado com sacarose 15% (SAC) ou NaCl 0,9% (C) e armazenados por 60 dias contra *E.coli* e *S. Typhimurium*

5.3.2 Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germe

Os níveis populacionais alcançados pela cultura fresca (CF), recém-liofilizada (CLT1) e liofilizada com 45 dias (CLT45) nas fezes dos animais gnotobióticos 24 horas após a monoassociação foram de $9,23 \pm 0,05$, $9,23 \pm 0,95$ e $8,94 \pm 0,03$ Log UFC/g, no 5º dia (T5) $9,87 \pm 0,09$, $9,57 \pm 0,10$ e $9,68 \pm 0,22$ Log UFC/g e no 10º dia (T10) $9,95 \pm 0,06$, $9,85 \pm 0,05$ e $9,95 \pm 0,13$ Log UFC/g, respectivamente (Figura 27). Os resultados indicaram que a liofilização não interferiu na capacidade de colonização intestinal da amostra *L. satsumensis* 18P-A em animais isentos de germe mesmo após 45 dias de armazenamento.

(Continua)



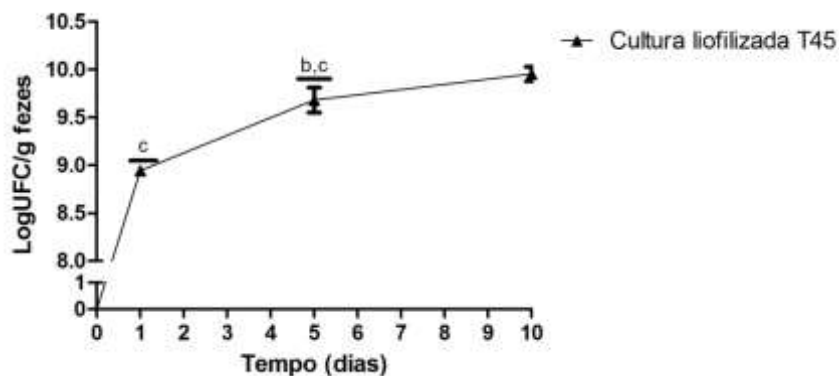


Figura 27. Níveis populacionais de *L. satsumensis* 18P-A cultura fresca, recém liofilizada (T1) e liofilizada com 45 dias de estocagem (T45) nas fezes dos animais gnotobióticos avaliadas 1, 5 e 10 dias após a monoassociação. Os níveis populacionais foram avaliados a partir de diluições em solução salina (NaCl 0,9%) seriadas de fezes obtidas dos respectivos animais e expressos como média e desvio-padrão de Log UFC/g de fezes. Cada grupo experimental foi composto por quatro animais suíços isentos de germe. As barras verticais indicam o desvio-padrão das médias. Comparando-se as culturas em cada tempo, letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de UFC/g de fezes. Ausência de letras sobre as barras ou presença de letras iguais sinalizam inexistência de diferenças significativas ($p > 0,05$).

5.3.3 Teste de antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Não foram observados halos de inibição de crescimento a partir das fezes dos animais monoassociados com a cultura fresca, recém-liofilizada e liofilizada com 45 dias da amostra *L. satsumensis* 18P-A contra os patógenos *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*.

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de *Lactobacillus* spp.

6.1.1 Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial e aos sais biliares

Para promover os efeitos benéficos como probiótico, o microrganismo deve resistir às condições adversas impostas pelo organismo do hospedeiro. O primeiro destes desafios é o suco gástrico, que contém as enzimas gástricas digestivas que funcionam em um pH extremamente baixo. Por outro lado, a manutenção do pH estomacal numa faixa ácida auxilia na proteção do indivíduo contra bactérias patogênicas de origem alimentar, uma vez que muitos patógenos são intolerantes a esta condição (Jin *et al.*, 1998). Os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia da bactéria ainda não foram completamente entendidos, mas a acidificação interna reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos para proteínas e para o DNA (Leeber *et al.*, 2008).

Na literatura, há uma grande variação em metodologias de avaliação de sensibilidade microbiana a suco gástrico, no que se refere à formulação simulada do suco gástrico, ao pH e ao tempo de exposição (Morelli, 2000; Strompfová *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2010; Pitino *et al.*, 2010; Da Conceição *et al.*, 2013). Neste estudo, foi utilizada uma formulação cuja composição e pH são muito próximos ao que é encontrado na secreção gástrica natural e o tempo utilizado está dentro da faixa de tempo média para a permanência do alimento no estômago que varia de uma a quatro horas (Troncon, 2008). A variabilidade de perfil de sensibilidade a suco gástrico entre as linhagens estudadas também é grande. No presente estudo, 63% dos isolados mantiveram sua capacidade de crescimento (inibição < 40%) após 2 horas de contato com o suco gástrico artificial, em pH 2,5. Silva *et al.*, (2013) caracterizaram 31 amostras de lactobacilos para uso como probiótico em cães e 58% delas foram resistentes ao pH 2,5 por 3 horas de exposição, valor bem próximo ao encontrado no presente trabalho. Zheng *et al.*, (2013), estudaram vários parâmetros de avaliação do potencial probiótico de lactobacilos isolados de grãos de kefir e a tolerância ao suco gástrico em pH 3,0 e 2,0 durante 3 horas de exposição foi utilizado como triagem. Pela avaliação da sobrevivência por contagem de células viáveis após o desafio, sete e três linhagens de um total de 10, respectivamente, apresentaram boa tolerância nas condições de pH a que foram expostas. Bao *et al.*, (2009) avaliaram a tolerância de 90 cepas de *L. fermentum*, isolados de produtos lácteos

naturalmente fermentados, em pH 3,0, 2,5 e 2,0 por 3 horas de exposição e trinta e cinco, onze e uma amostra, respectivamente, apresentaram boa tolerância nas condições testadas. O percentual de linhagens tolerantes ao suco gástrico encontrado neste estudo demonstra que é possível selecionar potenciais probióticos para uso humano de fontes alimentares.

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, os candidatos a probióticos têm como desafio os sais biliares intestinais, moléculas anfipáticas com atividade antimicrobiana que agem como detergentes, rompendo membranas biológicas (Leeber *et al.*, 2008). A concentração dos ácidos biliares no trato intestinal humano é de aproximadamente 0,3% (Walker e Gilliland, 1993). No presente trabalho, 4% e 25% das amostras, respectivamente, foram classificadas como resistentes e tolerantes (inibição <40% ou 60% ≥ inibição ≥ 40%) aos sais biliares. No trabalho de Silva *et al.* (2013) 45% e 47% das amostras, respectivamente, foram resistentes e tolerantes, valores bem distantes dos encontrados no presente ensaio. A origem dos lactobacilos pode explicar a discrepância entre nossos resultados e os de Silva *et al.* (2013) que isolaram os microrganismos de fezes caninas, portanto, do trato intestinal desses animais. É esperado que microrganismos isolados desse hábitat sejam muito mais adaptados a esta condição que aqueles isolados de matrizes alimentares, como é o caso das nossas amostras. No entanto, a sensibilidade a sais biliares varia mesmo entre microrganismos isolados de fontes alimentares semelhantes. Todas as amostras (n=10) caracterizadas por Zheng *et al.* (2013) e Golowczyc (2008) (n=11) foram resistentes a sais biliares na concentração de 0,3% enquanto no trabalho de Bao *et al.*, (2009) apenas onze amostras (n=90) se enquadraram neste perfil. Em todos os trabalhos foram testados microrganismos isolados de alimentos naturalmente fermentados (incluindo os grãos de kefir).

A análise dos nossos resultados mostrou similaridade com o trabalho de alguns autores e discrepância em relação ao de outros. Apesar disso, a avaliação da resistência ao suco gástrico e a sais biliares mostrou grande poder discriminatório entre as linhagens candidatas a probióticos, o que é interessante quando o objetivo é seleção.

6.1.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos é de relevância na caracterização de candidatos a probióticos para que não sejam selecionados possíveis

carreadores de genes de resistência e assim, evitar que estes sejam transferidos a microrganismos patogênicos e/ou indígenas de um ecossistema para o qual o probiótico se destina (Souza, 2006). As bactérias ácido-lácticas são naturalmente resistentes a vários antimicrobianos. Felizmente, para a maior parte dos antimicrobianos de uso clínico, esta resistência é codificada por genes que estão localizados no genoma do microrganismo e não em plasmídeos ou outros elementos móveis que podem ser transferidos (Lee e Salminen, 2009).

No presente trabalho, todos os isolados foram resistentes à vancomicina e oxacilina. Herreros, Sandoval e González (2005) também encontraram altas taxas de resistência à vancomicina e oxaciclina em cepas isoladas de queijo artesanal espanhol. Em relação à vancomicina, foram encontrados resultados semelhantes nos trabalhos de Teuber, Meile e Schwarz (1999), Danielsen e Wind (2003) e Zhou (2005). Do total de 52 isolados, trinta e nove (75%) foram resistentes à gentamicina. No trabalho de Charteris *et al.*, (1998) a maior parte das amostras testadas foram resistentes a gentamicina. Hummel *et al.*, (2007) avaliaram o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de fermento lácteo e detectaram sensibilidade a tetraciclina e eritromicina e resistência a gentamicina. No trabalho de Belletti *et al.*, (2009) grande parte das amostras foram resistentes à amicacina, penicilina, oxacilina e vancomicina e sensíveis à clindamicina, eritromicina e tetraciclina. Não foi encontrada na literatura nenhuma evidência de resistência cruzada entre os antimicrobianos gentamicina e amicacina, mas no presente trabalho foi observado que, das 39 amostras resistentes a gentamicina, 36 foram resistentes também à amicacina. De forma geral, todos os isolados testados apresentaram perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dentro do esperado para potenciais probióticos.

6.1.3 Antagonismo *in vitro*

Continuamente, inóculos microbianos patogênicos, carreados pelos alimentos e bebidas ingeridos, atravessam o trato digestivo e podem causar doenças de severidade diversa. No entanto, nem sempre a ingestão do patógeno ou de sua toxina resulta em doença. Uma das explicações para a ocorrência deste fenômeno de proteção no hospedeiro é a presença de uma microbiota intestinal que pode eliminar parcial ou completamente um patógeno introduzido no trato gastrintestinal (TGI). Este fenômeno, denominado resistência à colonização (RC) ou efeito de barreira microbiológico é, em parte, explicado pela produção de metabólitos inibitórios (ácidos orgânicos, H₂S e

H₂O₂) ou outras substâncias como bacteriocinas ou bacteriocinas-like. (Nicoli & Raibaud, 1990; Nicoli & Vieira, 2004). A habilidade de produzir substâncias antagonistas é extremamente desejável para um candidato a probiótico, uma vez que se espera do mesmo um comportamento similar ao exercido pela microbiota indígena do hospedeiro.

Na técnica de difusão em sobrecamada, utilizada neste trabalho para verificar a capacidade antagonista, as amostras produtoras são mortas pelo vapor de clorofórmio antes da adição da camada de ágar semi-sólido inoculado com a bactéria patogênica reveladora. Desta forma, o fenômeno de inibição é necessariamente devido à produção de substâncias difusíveis liberadas pelos microrganismos produtores durante o seu crescimento, que podem ser ácido láctico, bacteriocinas, bacteriocinas-like ou a combinação destes compostos (Nardi *et al.* 2005).

Cerca de 80% dos isolados produziram atividade antagonista contra pelo menos quatro bactérias patogênicas reveladoras e, aproximadamente 50% do total de lactobacilos testados, produziram halo de inibição contra todos os patógenos testados. Resultados semelhantes a estes foram encontrados nos trabalhos de Martins *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010; Alvim, 2011 e Silva *et al.*, 2013. A maior parte das amostras testadas (cerca de 85%) inibiram o crescimento de *S. Typhimurium* (S.T), *E. coli* (E.C), *P. aeruginosa* (P.A) e *S. aureus* (S.A) e estas mesmas bactérias foram as que apresentaram os maiores halos de inibição. Golowczyc *et al.* (2008) relataram forte poder inibitório de lactobacilos homofermentativos isolados dos grãos de kefir contra *S. Typhimurium* e *E. coli*. Uma porcentagem menor (aproximadamente 65%) dos isolados apresentou atividade antagonista contra *L. monocytogens* (L.M) e *E. faecalis* (E.F). Alvim (2011) avaliou a atividade antagonista de lactobacilos suínos e encontrou uma menor porcentagem de inibição assim como os menores halos contra *L. monocytogens* e *E. faecalis*. Resultado semelhante foi encontrado por Martins *et al.*, 2006. As infecções em humanos ou animais causadas por esses microrganismos estão associadas a um grande impacto econômico, seja com gastos em saúde pública, seja na pecuária. Há muito tempo se discute a utilização de probiótico como alternativa ao uso de antibióticos na saúde humana ou animal e os resultados deste ensaio mostraram que a maior parte dos isolados testados apresenta potencial para tanto.

6.1.4 Teste de hidrofobicidade de superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana é uma característica apontada como um importante indicador do potencial de adesão do microrganismo ao epitélio intestinal. (Mangoni, 2009). Superfícies hidrofóbicas possuem maior capacidade de adesão ao epitélio intestinal, pois a fixação entre microrganismo e epitélio é mediada, em partes, por interações desta natureza (Kos *et al.*, 2003).

O teste de Adesão Microbiana a Solventes (MATS) avaliou a afinidade do microrganismo ao xileno, um solvente apolar. Quanto maior a afinidade do microrganismo ao solvente, maior seu caráter hidrofóbico e então, maior a tendência de adesão ao epitélio, característica esta que é desejada em um microrganismo probiótico. Se isso não acontecer, é rapidamente eliminado pelo peristaltismo e pelas correntes de fluidos. (Turner, Dritz e Minton, 2001; Tahmourespour *et al.*, 2008).

No presente trabalho, a maior parte dos isolados (67%) apresentou superfície celular hidrofóbica (MATS >66%). Alvim (2011) e Silva *et al.*, (2013) avaliaram a hidrofobicidade de lactobacilos isolados do TGI de porcos e cães, respectivamente. Em ambos os trabalhos foram encontradas um percentual baixo de isolados com alta hidrofobicidade. Pelletier *et al.*, (1997) investigaram a hidrofobicidade de oito linhagens de lactobacilos de três espécies diferentes e relataram baixa hidrofobicidade das amostras. No trabalho de Nader-Macías *et al.* (2008) 92,2% das amostras apresentaram baixa hidrofobicidade (MATS < 33%). Golowczyc *et al.* (2008) classificaram todos os lactobacilos isolados dos grãos de kefir como hidrofílicos. Embora a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura demonstre número maior de lactobacilos com baixa hidrofobicidade de superfície celular com os lactobacilos, este trabalho aponta para uma direção contrária. Algumas das possíveis explicações para esta discrepância podem ser: diferenças nos critérios de classificação entre hidrofóbico, moderadamente hidrofóbico e hidrofílico; utilização de solventes apolares diferentes (xileno ou hexadecano, por exemplo,) e as fontes de carbono disponíveis no ambiente onde as linhagens foram isoladas que podem influenciar a composição da parede celular e conseqüentemente o seu caráter hidrofóbico/hidrofílico, conforme foi mostrado no trabalho de Anderson *et al.*, 1990.

6.2 Preservação de *Lactobacillus* spp. selecionados pelos testes *in vitro*

6.2.1 Avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus* spp. após liofilização e estocagem

Por definição, probióticos devem chegar vivos ao consumidor e para tanto, precisam estar contidos num alimento ou numa formulação farmacêutica que ofereça estabilidade e permita sua sobrevivência durante todo o período de armazenamento do produto. Mas a sobrevivência não é o único fator importante para atuação de um probiótico. Os níveis populacionais do microrganismo devem ser suficientemente elevados para ter um impacto no local onde se espera que ele desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana, considera-se que um microrganismo poderá agir no ecossistema onde ele se encontra somente quando presente em população igual ou superior a 10^7 células viáveis/g do conteúdo (Nicoli & Vieira, 2004). A concentração em células viáveis do probiótico deve ser, portanto, ajustada na preparação inicial, levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do microrganismo sem se multiplicar no tubo digestivo e o efeito de diluição intestinal de maneira a atingir no mínimo 10^7 células viáveis/g do conteúdo intestinal. Considera-se, portanto, que a concentração em células vivas dos probióticos no produto a ser ingerido deve estar pelo menos de 10^8 a 10^9 UFC/dose diária (Rybka & Fleet, 1997; Vinderola & Renheimer, 2000)

Dentre as diversas técnicas de preservação de culturas microbianas disponíveis, a liofilização merece destaque por sua ampla utilização pela indústria. O método oferece inúmeras vantagens, entre as quais podem ser citadas a manutenção da viabilidade por longo período e facilidade no armazenamento das culturas após o processo (Strasser *et al.*, 2008). Durante a liofilização, as células microbianas estão expostas a injúrias que interferem com a integridade e fluidez da membrana plasmática (Schwab *et al.*, 2007), desnaturação de proteínas e danos ao DNA (Lievence *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1995) que podem comprometer sua viabilidade. Estes danos ocorrem principalmente devido aos cristais de gelo intracelular formados durante o congelamento da amostra, etapa que antecede à sublimação da água. A utilização de crioprotetores reduz o *stress* físico causado à célula microbiana pelo gelo e, portanto, contribuem para o aumento da viabilidade após o processo (Li *et al.*, 2011)

Os crioprotetores usados nos experimentos foram selecionados por serem eficientes e mais comumente utilizados para manutenção de viabilidade celular, de acordo com dados da literatura científica (Tsvetkov & Brankova, 1983; Castro, Teixeira

& Kirby, 1997; Abadias, *et al.*, 2000; Zayed & Roos, 2003; Strasser, *et al.*, 2008; Bolla, *et al.*, 2010; Li, *et al.*, 2011; Nivoltez, *et al.*, 2012).

No presente trabalho, foi observado que, de maneira geral, a adição dos crioprotetores aumentou a taxa de sobrevivência, após liofilização e armazenamento por 30 dias a 10°C, em relação ao grupo controle (NaCl 0,9% p/v). Para algumas amostras, o efeito benéfico do crioprotetor foi mais evidente, como é o caso da amostra *L. mali* 21U2-A que apresentou taxa de sobrevivência em torno de 96,37% após 30 dias na formulação com leite desnatado 20% e, na ausência do crioprotetor, a viabilidade caiu para 20,53%. Embora o controle das amostras *L. casei* 17U-A, *L. satsumensis* 18P-A e 23P3-L e *L. diolivorans* 1Z-A tenham apresentado taxas de sobrevivência superiores a 70% (portanto consideradas estáveis segundo a classificação de Fry, 1966), na presença dos crioprotetores esta alcançou 95%. Estes resultados confirmam a importância do uso de substâncias crioprotetoras nas formulações para liofilização, fato também demonstrado por Tsvetkov & Brankova (1983), Leslie *et al.* (1995) e Li, *et al.* (2011).

O uso de amido e alginato de sódio resultou nas menores taxas de sobrevivência obtidas, exceto para a amostra 23P3-L, para a qual não houve diferença entre a porcentagem de sobrevivência do controle e das formulações com esses dois crioprotetores. Por essa razão, o uso dessas duas substâncias foi abandonado e as amostras *L. diolivorans* 1Z-A e *L. kefiranofaciens* 8U-L, as duas últimas a serem avaliadas, não foram liofilizadas com tais crioprotetores. Estes resultados são corroborados por Champagne & Garder (2001) que relataram baixa taxa de sobrevivência após liofilização de *Streptococcus thermophilus* em alginato de sódio. Além disso, a maior parte dos trabalhos publicados na literatura científica imobilizam as células microbianas em esferas de alginato de cálcio para posteriormente submetê-las a liofilização (Kearney *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 2004). No presente trabalho, optou-se por avaliar a eficiência do alginato de sódio de uma forma mais simples, apenas pela elaboração de uma suspensão microbiana e não pela microencapsulação dos lactobacilos em alginato de cálcio. A utilização de amido como crioprotetor para culturas microbianas poderia ser uma alternativa interessante pelo seu baixo custo, porém não foi encontrado nenhum trabalho na literatura científica que o utilizasse como crioprotetor para microrganismos.

Por outro lado, a adição de leite desnatado, trealose ou sacarose proporcionaram taxas de sobrevivência superiores a 85% para todos os isolados testados e número de células viáveis superior a 10^8 UFC/g de produto liofilizado, que foi mantida durante o

armazenamento. Li, *et al.* (2011) estudaram o efeito do leite desnatado, trealose e sacarose na viabilidade de *Lactobacillus reuteri*. Segundo os autores, os melhores resultados foram obtidos pela utilização de leite desnatado e trealose, com taxas de sobrevivência em torno de 95 e 93%, respectivamente. A viabilidade do microrganismo na formulação com sacarose foi quase 90%, resultado igualmente interessante e bem próximo aos encontrados no presente trabalho. Tsvetkov & Brankova (1983), avaliaram a viabilidade de cepas de *Lactobacillus* e *Micrococcus* após liofilização na presença de diferentes crioprotetores. As formulações com leite desnatado e sacarose proporcionaram as maiores taxas de sobrevivência entre todas as testadas para o lactobacilo. Bolla, *et al.* (2010) estudaram o efeito protetor de leite *in natura* e de leite fermentado (com e sem adição de sacarose e trealose) em uma mistura microbiana composta por bactérias e leveduras isoladas dos grãos de kefir. Em relação ao número de células viáveis, foi observado efeito protetor satisfatório na formulação com leite e nenhum efeito protetor adicional foi obtido pela adição dos dois açúcares. Zayed & Roos (2004), avaliaram o efeito da sacarose, leite desnatado e trealose, e misturas formadas pela combinação dessas substâncias, na viabilidade de *Lactobacillus salivarius*. Logo após a liofilização, os autores relataram taxas de sobrevivência inferiores a 40% nas formulações com apenas um dos crioprotetores. No presente trabalho, taxas superiores a esta foram alcançadas por todas as amostras mesmo na ausência de crioproteção. Zayed & Roos (2004) só conseguiram resultados semelhantes ao deste trabalho combinando leite desnatado, sacarose e trealose numa única formulação.

.O sucesso da liofilização depende em grande parte da adição dos crioprotetores à formulação e a eficiência de cada agente crioprotetor depende do seu mecanismo de proteção. No entanto, já foi demonstrado na literatura que, a sensibilidade ou resistência frente à liofilização esta relacionada também à linhagem do microrganismo. Sob circunstâncias comparáveis ou em condições padronizadas, diferentes linhagens da mesma espécie podem diferir no seu comportamento durante a liofilização (Lian, Hsiao, & Chou, 2002) ou na estocagem (Carvalho *et al.*, 2003). Embora a variabilidade inter-linhagem tenha sido descrita em alguns trabalhos, poucas explicações foram dadas até o momento. Algumas hipóteses foram sugeridas: (I) diferenças na constituição genética pode levar a diferenças no fenótipo entre linhagens de *Lactococcus lactis* (O'Callaghan & Condon, 2000) e (II) diferenças na composição da parede celular e membrana plasmática, com diferentes pontos de fusão entre os fosfolipídeos, podem causar

diferenças entre as linhagens (Selmer-Olsen *et al.*, 1999). No presente trabalho, *L. satsumensis* 18P-A manteve a contagem de células viáveis estável durante 120 dias de armazenamento sem adição de crioprotetores, ao contrário de *L. satsumensis* 23P3-L. Embora a diferenciação, em termos de linhagem, não tenha sido realizada para estes dois microrganismos, os mesmos foram isolados de amostras de grãos de kefir de diferentes localidades (Curitiba e Salvador) e meios de cultivo (água açucarada e leite). Portanto, existe uma grande chance de que sejam de linhagens diferentes. Assim, as diferenças verificadas na contagem de células viáveis entre as duas culturas podem ser devido às hipóteses sugeridas por O'Callaghan & Condon (2000) e Selmer-Olsen *et al.*, (1999).

Os resultados obtidos por este trabalho reforçam a premissa discutida na literatura científica, de que todas as condições (incluindo a escolha do crioprotetor) que possam afetar a viabilidade da cultura microbiana devem ser testadas caso a caso, isto, é, em separado para cada microrganismo que se pretenda preservar.

6.2.2 Capacidade de reativação *in vitro*

Uma vez ingeridas, uma rápida e eficiente reativação das células probióticas é necessária para que elas possam demonstrar os seus efeitos benéficos ao longo da maior extensão possível do trato digestivo já que os microrganismos patogênicos podem atuar em diferentes porções. Os probióticos são selecionados para sobreviver no trato gastrointestinal, mas não são capazes de se multiplicar e de colonizar este ecossistema já que a microbiota indígena, ainda que perturbada, é capaz de impedir esta instalação (Nicoli & Vieira, 2004). Diante dos fluxos que percorrem o trato digestivo, os probióticos se comportam, portanto, como marcadores de trânsito e têm relativamente pouco tempo para sua reativação e posterior atuação. O trânsito colônico total normal dura de 24 a 48 horas (Magalhães, 2004) e é exatamente este tempo que o probiótico dispõe para se reativar no tubo digestivo.

No presente trabalho, a cinética de reativação foi determinada pela capacidade de crescimento (medida da absorbância a 600nm) em caldo MRS a 37°C durante 18 horas. Após a liofilização houve uma alteração, em maior ou menor extensão, da velocidade e/ou do rendimento do crescimento de todas as linhagens testadas. Ao comparar as curvas de crescimento antes da liofilização e após o processo foi percebido, de uma forma geral, um prolongamento da fase lag e um menor rendimento de biomassa

(medida de absorvância). No entanto, ao comparar a curva controle (NaCl 0,9% p/v) com cada um dos crioprotetores foi constatado para a maioria dos isolados uma melhora em ambos os parâmetros. Contudo, esta não ocorreu de maneira uniforme entre os isolados testados e, por essa razão, os resultados foram descritos separadamente para cada amostra ou agrupados quando os perfis de reativação de dois ou mais isolados foram similares. Estes resultados também podem ser explicados pelos diferentes mecanismos de ação dos crioprotetores e por características específicas de cada isolado, conforme sugerido por O'Callaghan & Condon (2000) e Selmer-Olsen *et al.*, (1999).

Além disso, pela comparação entre a curva de reativação antes, logo após a liofilização e durante diferentes tempos de armazenamento, é possível avaliar, de uma forma indireta, a extensão do dano causado à célula microbiana pelo processo de desidratação e assim, decidir com base em mais um critério, se o método de preservação é adequado ou não àquela cultura. Bactérias do ácido lático além de serem utilizadas como probióticos em alimentos funcionais e formulações farmacêuticas, são também amplamente utilizadas pela indústria como culturas-iniciadoras na elaboração de diversos produtos fermentados e, portanto, é essencial garantir a vitalidade dessas culturas após a liofilização e por longo tempo de estocagem (Selmer-Olsen *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 2004; Li *et al.*, 2011).

Se a avaliação da sobrevivência pela contagem de células viáveis fosse o único parâmetro para determinar a sensibilidade do microrganismo frente à liofilização, todos os isolados testados seriam selecionados já que, a adição de pelo menos um dos crioprotetores garantiu quantidade superior a 10^8 UFC/g do produto liofilizado. No entanto, a avaliação da reativação mostrou ser um critério bem mais excludente já que um número menor de isolados e crioprotetores foram capazes de preservar de maneira satisfatória tal habilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Martins *et al.*, (2004) que avaliaram a viabilidade e a capacidade de reativação de seis produtos probióticos comerciais contendo a levedura *Saccharomyces boulardii* e, embora quatro deles tivessem apresentado contagem, em UFC/g de produto, condizente para atuação como probiótico, apenas um dos produtos apresentou capacidade de reativação satisfatória.

6.3 Avaliação do efeito do processo de liofilização sobre propriedades probióticas de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A

6.3.1 Teste de antagonismo *in vitro* da linhagem contra bactérias patogênicas

A avaliação da produção de substâncias antagonistas contra patógenos por microrganismos potencialmente probióticos, é realizada na cultura fresca, mas raramente é testada no produto manufaturado (Nivoliez *et al.*, 2012). Vários autores já relataram a influência dos processos de conservação de culturas microbianas, incluindo a liofilização, nas propriedades probióticas dos microrganismos, como tolerância a sais biliares e suco gástrico, produção de ácido e peróxido de hidrogênio, atividade antagonista contra patógenos, dentre outras (Bolla *et al.*, 2010; Nivoliez, *et al.*, 2012).

A liofilização não interferiu na capacidade antagonista de *L. satsumensis* 18P-A contra os patógenos testados, habilidade esta que já tinha sido verificada na cultura fresca. Bolla *et al.* (2010) demonstraram que a atividade antagonista contra *Shigella sonnei* foi preservada após liofilização de uma mistura microbiana composta por bactérias e leveduras isoladas dos grãos de kefir. Nivoliez *et al.* (2012) estudaram a influência da industrialização nas propriedades probióticas de três formulações comerciais contendo *Lactobacillus rhamnosus* Lcr 35. Os autores compararam a atividade antagonista da cultura fresca e do produto industrializado e demonstraram que a atividade antagonista contra *S. flexineri* e *E.coli* (ETEC, EPEC) foram mantidas. No entanto, para uma das formulações testadas, a capacidade de inibição do lactobacilo foi menor para *Candida albicans* pelo produto industrializado em relação à cultura fresca, mostrando claramente a influência negativa do processamento especificamente sobre a capacidade de inibição da levedura pelo lactobacilo.

Adicionalmente, o tamanho dos halos de inibição gerados por *L. satsumensis* 18P-A liofilizados com sacarose 15% foram maiores em comparação com aqueles obtidos pela cultura controle (NaCl 0,9% p/v). A presença do crioprotetor pode ter preservado melhor a capacidade do lactobacilo de produzir a substância(s) antagonista(s). No entanto, tal fato carece de uma investigação mais detalhada.

6.3.2 Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germe

Outra característica desejada para um probiótico é a sua capacidade de adesão à parede intestinal, permitindo sua permanência, mesmo que transitória, no ecossistema intestinal. Muitos mecanismos estão envolvidos na adesão de microorganismos à mucosa intestinal, sendo um deles a natureza hidrofóbica da superfície (Vinderola & Reinheimer, 2003; Barbosa *et al.*, 2005; Klayraung *et al.*, 2008). Além disso, a capacidade de se ligar à superfície de células intestinais é um pré-requisito para o desenvolvimento dos mecanismos de ação dos probióticos como a exclusão ou redução de aderência de enteropatógenos (provavelmente pela competição pelos receptores que seriam utilizados pelos patógenos) e a estimulação do sistema imunológico (Bernet *et al.*, Martins *et al.*, 2009).

Vários autores já relacionaram o fracasso da liofilização com os danos causados à parede celular e/ou membrana plasmática do microorganismo durante o processo (Wagman 1960; Sinsky & Silverman 1970; Lievense *et al.* 1994; Castro, Texeira & Kirby, 1997). Como a adesão à mucosa intestinal é mediada, em parte, pela superfície microbiana, um dano causado a esta estrutura poderia resultar em falha na ligação entre microorganismo e o epitélio. (Pérez *et al.*, 1998; Del Re *et al.*, 2000).

Os modelos animais apresentam como principal vantagem, em relação aos testes *in vitro*, a representação de complexidade mais próxima à realidade presente nos organismos aos quais os probióticos se destinam. Logo, a distância de extrapolação dos resultados obtidos em testes com animais para o organismo de destino do probiótico (no caso, os humanos) é muito menor, permitindo que as expectativas de efeito sejam mais confiáveis em relação àquelas obtidas num ensaio *in vitro*. O modelo de monoassociação em animais isentos de germe representa um sistema experimental excelente para avaliação do potencial de colonização, pois permite o estudo da capacidade de sobrevivência de um único isolado no ambiente gastrointestinal sem a interferência e competitividade da complexa microbiota presente no intestino de animais (Lee & Mazmanian, 2010). Segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde para a seleção de probióticos, após a identificação e seleção *in vitro* de probióticos e antes de ensaios nos organismos aos quais eles se destinam, a utilização de modelos animais é recomendada como “padrão-ouro” para a avaliação das

características funcionais e de segurança de bactérias potencialmente probióticas (FAO/WHO, 2002).

Portanto, com o objetivo de verificar o efeito da liofilização sobre a capacidade de adesão e colonização da amostra *L. satsumensis* 18P-A, foi feita a monoassociação em animais suíços isentos de germe que foram inoculados com a linhagem 18P-A em cultura fresca (CF), em formulação recém-liofilizada (CLT1) e em formulação estocada por 45 dias após a liofilização (CLT45). Todos os animais receberam uma dose única de 10^8 UFC do lactobacilo. Durante 10 dias foram acompanhados os níveis populacionais dos isolados nas fezes de animais gnotobióticos, sendo esta medida um indicativo da sobrevivência pela passagem do trato gastrointestinal superior e de colonização do intestino.

A análise dos resultados revelou que a liofilização e o armazenamento não interferiram na capacidade de colonização intestinal da amostra *L. satsumensis* 18P-A em animais gnotobióticos. Os níveis populacionais nas fezes dos animais permaneceram altos, acima de 10^9 UFC/g, ao longo de todo o período de monoassociação. Houve diferença estatística entre o número de células viáveis nas fezes em alguns tempos quando comparadas cultura fresca ou cultura recém liofilizada e cultura liofilizada após 45 dias de estocagem. Essas diferenças não são surpreendentes, se levarmos em consideração os resultados do teste de reativação *in vitro* da cultura 18P-A que mostraram uma tendência a aumento de fase lag ao longo do período de armazenamento após a liofilização. A cultura liofilizada e armazenada por 45 dias precisou de um tempo maior para que sua população chegasse ao mesmo nível populacional alcançado pela cultura fresca e recém-liofilizada. No entanto, ao longo do tempo de monoassociação, todas as culturas foram capazes de alcançar um nível populacional semelhante e suficiente para garantir o efeito probiótico.

6.3.3 Teste de antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Embora a produção de substância(s) antagonista difusível(eis) tenha sido detectada nos testes *in vitro* pela culturas fresca e liofilizada contra as duas bactérias patogênicas, o mesmo não ocorreu no teste *ex vivo*.

A produção de metabólitos antimicrobianos demonstrada *in vitro*, não necessariamente se confirma em ensaios *in vivo* ou *ex vivo*. Já foi demonstrado que estirpes produtoras de substâncias antagonistas *in vitro* podem não expressar atividade

no trato digestivo de animais gnotobióticos (Duval-Iflah *et al.* 1981). Por outro lado, a produção de compostos antagonistas poderia ocorrer nas regiões mais altas do trato digestivo, com uma posterior inativação por enzimas proteolíticas ou substâncias inibitórias (Bambirra *et al.*, 2007). Curiosamente, um fenômeno contrário foi demonstrado no trabalho de Ramaré *et al.*, (1993) no qual foi verificado que uma cepa de *Peptostreptococcus* só exibiu atividade antagonista *in vivo*, mas não *in vitro*. Foi comprovado que a substância responsável pelo antagonismo precisava sofrer ação proteolítica da enzima tripsina para exercer atividade contra *C. perfringens*

No entanto, este resultado não impede uma possível ação protetora de *L. satsumensis* 18P-A contra infecções como salmonelose ou listeriose, já que outros mecanismos poderiam explicar os efeitos benéficos exercidos por um candidato a probiótico. Muitos trabalhos tem sugerido que BAL melhoram a resistência à infecção pela modulação do sistema imunológico, aumentando a atividade de macrófagos ou aumentando a produção de anticorpos e citocinas (Neumann *et al.* 2009; Perdigon *et al.* 1999; Matsuguchi *et al.* 2003; Castanheira *et al.* 2007; Steinberg, 2012). Outra explicação é a competição por sítios de ligação em comum (Forestier *et al.*, 2001) ou a regulação da expressão de mucina por BAL, que impedem a adesão de patógenos na superfície intestinal e sua posterior translocação (Mack *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÕES

De um total de 52 culturas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram selecionadas dez candidatas a probióticos, baseado no perfil de sensibilidade a suco gástrico e sais biliares, hidrofobicidade da superfície celular, capacidade antagonista contra patógenos e susceptibilidade a antimicrobianos *in vitro*.

Todas as 10 culturas selecionadas foram submetidas à liofilização na presença de diferentes crioprotetores e apresentaram, em pelo menos uma formulação, após 30 dias de estocagem sob refrigeração, contagem de células viáveis suficientes para sua atuação como probiótico.

O número de células viáveis de *Lactobacillus satsumensis* 18P-A permaneceu estável durante 180 dias de armazenamento a 10°C e em quantidade superior a 10⁹UFC/g de produto liofilizado, mesmo na ausência de crioprotetor. A atividade antagonista *in vitro* contra bactérias patogênicas Gram positivo e Gram negativo permaneceu inalterada após liofilização e armazenamento da cultura. A liofilização e o armazenamento também não interferiram com a sua capacidade de sobrevivência e colonização no trato gastrointestinal de animais suíços isentos de germe. Essa linhagem possui, pelos motivos citados acima, um potencial probiótico considerável, devendo sua funcionalidade ser testada em ensaios *in vivo*.

Portanto, para uma seleção mais apropriada de estirpes microbianas probióticas de interesse industrial, deve-se fazer tanto a avaliação de aspectos tecnológicos quanto funcionais.

8. REFERÊNCIAS

- ACKER, J. P. & MCGANN, L. E. **Protective Effect Of Intracellular Ice During Freezing?** *Cryobiol.* 46:197-202. 2003.
- ANDERSON, J.; MIHALIK, R., SOLL D. R. **Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the Candida opaque phenotype.** *J. Bacteriol.*, v. 172, pp. 224-235, 1990
- ADAMS, M. R., MARTEAU, P. **On the safety of lactic acid bacteria from food.***Int J Food Microbiol.* 27, 263-264. 1995.
- ALVIM, L.B, **Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas de diferentes mucosas de suínos com potencial probiótico para suplementação alimentar, promoção do crescimento e como adjuvante imune.** 2011. 65f. Dissertação (mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ANGULO, L., LOPEZ, E., LEMA, C. **Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain).** *J. Dairy Res.* 60, 263-267. 1993.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo*, v. 25, n. 1, p. 55-58, 2005
- APELLA, M. C., GONZÁLEZ, S. N., NADER DE MACIAS, M. E., ROMERO, N., OLIVER, G. *In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 480-483, 1992.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.** 3rd ed. *New York: Marcel Dekker*, p.1-66. 2004.
- BAMBIRRA, F.H.S. ; LIMA, K.G.C. ; FRANCO, B.D.G.M. ; CARA, D.C. ; NARDI, R.M.D. ; BARBOSA, F.H.F. ; NICOLI, J.R. . **Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice.** *Letters in Applied Microbiology* v. 45, p. 663-667. 2007.
- BAO Y, ZHANG Y, LIU Y, WANG S, DONG X, *et al.* **Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products.** *Food Control* 21: 695–701, 2010.
- BARBOSA, F. H. F.; SILVA, A. M.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. **Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, p. 1-11, 2005.

BASU, S., PAUL, D.K., GANGULY, S., CHATTERJEE, M., CHANDRA, P.K. **Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial.** *J. Clin. Gastroenterol*, 34, p. 208-213, 2009.

BELLETTI, N. et al. **Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses.** *Jour. Food Protect.*, vol. 72, n. 10, p. 2162–2169, 2009.

BERNET-CAMARD M. F., LIEVIN V., BRASSART D., NEESER J. R., SERVIN A. L., HUDAULT S. **The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2747-2753. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RESOLUÇÃO Nº 5, DE 13 DE NOVEMBRO DE 2000.** Dispõe sobre a inspeção de alimentos de origem animal. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 28/01/2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 46 de 23 de Outubro de 2007.** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em: http://www.cidasc.sc.gov.br/html/servico_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%20%20D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%2046_07_RTIQ%20leites%20fermentados.pdf Acesso em: 28/01/2014

BOLLA, P. A., SERRADELL, M. A., URRAZA, P.J., ANTONI, G.L. **Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir.** *Journal of Dairy Research*.78: 15-22. 2011.

CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X., GIBBS, P. **Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii*spbulgaricus.** *Int Dairy J.* 13, 463-468. 2003.

CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X., GIBBS, P. **Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria.** *Int Dairy J.* 14, 835-847. 2004.

CASTANHEIRA L. G., CASTRO J. M., MARTINS-FILHO O. A., NICOLI J. R., VIEIRA L. Q., AFONSO L. C. ***Lactobacillus delbrueckii*as a potential skin adjuvant for induction of type 1 immune responses.***Front Biosci.* 12, 1300-1307. 2007.

CASTRO, H. P., TEIXEIRA, P. M., KIRBY, R. **Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze-drying.** *Journal of Applied Microbiology*, 82, p.87-94. 1997.

CHAMPAGNE, C. P., GARDNER, N. J. **The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophiles* to air and freeze-drying.** *Electron. J. Biotechnol*, v.4, p.1-5. 2001

CHARTERIS, A. **Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species.***Journal of Food Protection*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

COCONNIER, M. H., BERNET, M. F., KERNÉIS, S. CHAUVI~ERE, G., FOURNIAT, J. SERVIN, A. L. **Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion.** *FEMS Microbiol. Let.* 110: 299-306, 1993

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for fermented milks.***Codex Stan 243-2003.* Revision, 2010. Roma, 2010.

CONCEIÇÃO, L.L. DA; LEANDRO, E.S; FREITAS, F.S.; OLIVEIRA, M.N.V. DE, FERREIRA-MACHADO, A.B., BORGES, A.C; MORAES, C.A. DE. **Survival of *L. delbrueckii* UFV H2b20 in fermented milk under simulated gastric and intestinal conditions.** *Beneficial microbes*, v.4, n.3, p.285-289. 2013

CORCORAN, B.M., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., STANTON, C. **Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances.** *Journal of Applied Microbiology.* 96, 1024-1039. 2004.

COSTA, E.C. **Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação.** 115p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. 2010.

CROSS, M. L. **Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health,** *ClinApplImmunol Rev.* 3, 115-125. 2002.

DANIELSEN, N.; WIND, A. **Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents.** *Inter. Jour. Food Microbiol.*, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.

DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI. G.P., ALLESINA. S., BARBA, M., DEIDDA, F., LORENZINI, P., ALLARE, M., MONTINO, F., ORSELLO, M., SARTORI, M., GARELLO, E., CARMAGNOLA, S., PAGLIARULO, M., CAPURSO, L. **Probiotics: from research to consumer.** *Digestive and Liver Disease* 38, 248-255. 2006.

DEL RE B., SGORBATI B., MIGLIOLI M., PALENZONA D. **Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*.** *Lett. Appl. Microbiol.*, 31: 438-442. 2000

DE WAARD R., GARSSSEN J., BOKKEN G. C., VOS J. G. **Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats.***Int. J. Food Microbiol.* 73, 93-100. 2002.

DESMOND, C., ROSS, R.P., O'CALLAGHAN, E., FITZGERALD, G., STANTON, C. **Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia.** *Journal of Applied Microbiology.* 93, 1003-1011. 2002.

DUVAL-IFLAH, Y.; RAIBAUD, P.; ROUSSEAU, M. **Antagonism among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice.** *Infect. Immun.*, 34, p.957-969, 1981.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus* (2014).** Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em: 02/02/2014

FANG, H., ELINA, T., HEIKKI, A. AND SEPPO, S. **Modulation of humoral immune response through probiotic intake.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 29, 47-52, 2000.

FAO/WHO, **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria.** Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report ,1-34, 2001.

FAO/WHO, **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report ,1-11, 2002

FARNWORTH, E.R. **Kefir: from folklore to regulatory approval.** *J. Nutraceut. Funct. Med. Foods.* 1, 57-68. 1999.

FARNWORTH, E.R. **Kefir-a complex probiotic.** *Food Sci. Technol. Bull.: Funct. Foods.* 2, 1–17. 2006.

FARNWORTH, E.R. **The evidence support health claims for probiotics.** *The Journal of Nutrition.* 138, 1250-1254. 2008

FERREIRA, V., SOARES, V., SANTOS, C., SILVA, J., GIBBS, P. A., TEIXEIRA, P. **Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate.** *Biotechnology Letters.* 27, 249-252. 2005.

FORESTIER, C., DE CHAMPS, C., VATOUX, C. JOLY, B. **Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties.** *Res Microbiol* 152, 167–173. 2001.

FRY, R. M. **Freezing and drying of bacteria.** *Cryobiology.* H. T. Meryman, Ed. p.665-696. Academic Press, New York/London,1966..

FULLER, R. (ed.) **Probiotics 2: applications and practical aspects.** Chapman & Hall, New York, 212p. 1997.

FURUKAWA N., MATSUOKA A., TAKAHASHI T., YAMANAKA Y. **Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice.** *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 43, 450-453. 1990.

FURUKAWA, N., A. MATSUOKA, T. TAKAHASHI, AND Y. YAMANAKA. **Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A.** *Anim. Sci. Technol.* 62, 579-585. 1991.

GARDINER, G., O'SULLIVAN, E., KELLY, J., AUTY, M. A. E., FITZGERALD, G. F., COLLINS, J.K., ROSS, R.P., STANTON, C. **Comparative survival of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying.** *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 2605-2612. 2000.

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L. **Preservation of kefir grain a comparative study.** *Lebensmittel-Wissenschaft/Technologie.* 3, 77-84. 1997.

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G. L. **Chemical and microbiological characterisation of kefir grains.** *Journal of Dairy Research,* 6: 639-652. 2001.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd edition, release 5.0. New York: Springer-Verlag. 2004.

GILLILAND, S. E., KIM, H. S. **Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans** *J. Dairy Sci.* 67, 1-6. 1984.

GOLOWCZYC M., MOBILI P., GARROTE G.L., ABRAHAM A.G., DE ANTONI G.L. **Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis.** *Int J Food Microbiol* 118, 264-273. 2007.

GOLOWCZYC M, GUGLIADA M, HOLLMANN A, DELFEDERICO L, GARROTE G, ABRAHAM A, SEMORILE L & DE ANTONI G. **Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic.** *Journal of Dairy Research* 75 211-217. 2008

GOLOWCZYC, M. A., SILVA, J., ABRAHAM, A. G., DE ANTONI, G. L., TEIXEIRA, P. **Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying.** *Letters in Applied Microbiology.* 50, 7-12. 2009.

GOLOWCZYC, M. A., GEREZ, C. L., SILVA, J., ABRAHAM, A. G., DE ANTONI, G. L., TEIXEIRA, P. **Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions.** *Biotechnol Lett.* 33, 681-686. 2011.

GUO, X.H., *et al.* **Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrains probiotics based on in vitro functional properties.** *Anaerobe*, Amsterdam, v.16, p.16, p.321-326, 2010.

GUVEN, A., GULMES, M. **The effect of Kefir and vitamin E-supplemented diets on the activities of GSH-Px, GST, CAT, and LPO levels in mice tissues.** *Journal of Veterinary Medicine B.* 50, 412-416. 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; *J. Dairy Sci.* 83:275, 2000.

HAMMES, W. P., HERTEL C. **The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The prokaryotes – An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.** *Release* 3, 15. 2003.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL H.; GONZÁLEZ, L. **Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese).** *Jour. Food Microbiol.*, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005

HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. **Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion.** *J. Amer. Diet. Assoc.* 153, 582-587. 2003.

HOLMES, Z. A.; SOLENDER, A. **Macrostructure of selected raw starches and selected heated starch dispersion.** *Journal of the American Dietetic Association*, v. 78, p. 153-160, 1981.

HUANG, L., LU, Z., YUAN, Y., LU, F., BIE, X. **Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology.** *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33, 55-61. 2006

HUBALEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.** *Cryobiology.* 46, 205-229. 2003.

ISHIDA-FUJII K., SATO R., GOTO S., YANG X. P., KUBOKI H., HIRANO S., SATO M. **Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei*I-5.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 866-873. 2007.

ISCOLD, A. A. ; PENNA, F J ; PÉRET FILHO, L. A. ; NICOLI, J. R. ; AFONSO, L C C . **Efeito do tratamento de crianças hospitalizadas com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 sobre a frequência de diarreia induzida por antibióticos.** In: XI Semana de Iniciação Científica, 2002, Belo Horizonte. 2002.

ISOLAURI E, SUTAS Y, KANKAANPAA P, ARVILOMMI H , SALMINEN S. **Probiotics : effects on immunity.** *The American journal of clinical nutrition*, 73, 444–450. 2001.

JIN, L. Z. *et al.* **Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 183-185, Sep 1998

JOHNSON-HENRY K.C., HAGEN K.E., GORDONPOUR M., TOMPKINS T.A., SHERMAN P.M. **Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells.** *Cell Microbiol* 9, 356–367. 2007.

KAUR, I.P., CHOPRA, K., SAINI, A. **Probiotics: potential pharmaceutical applications.** *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1-9. 2002.

KEARNEY L, UPTON M, LOUGHLIN AMC. **Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads incorporating cryoprotectants.** *Appl Environ Microbiol.*; 56: 3112-3116.1990.

KING, V.A.E, J. SU. **Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*.** *Process Biochem.*, 28: 47-52. 1994

KLAVER, F. A. M., VAN DER MEER, R. **The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* due to their bile salt-deconjugating activity.** *Appl. Environm. Microbiol.*59, 1120-1124. 1993.

KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; SIRITHUNYALUG, J.; OKONOJI, S. **Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Thai Tradicional Food.** *Scientia Pharmaceutica*,v. 76, p. 485-503, 2008.

KHORAMNIA, A., ABDULLAH, N., LIEW, S.L., SIEO, C.C., MASAMY, K HO, Y.W. **Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology.** *Animal science Journal.* 82, 127-135. 2011.

KOS, B., SUSKOVIC, J., VUKOVIC, S., SIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOSIC, S. **Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92.** *J Appl Microbiol*, 94, 981-987, 2003.

LEE, J.S., CHA, D.S., PARK, H. J., **Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, p. 7300-7305. 2004.

LEE, Y.K; SALMINEN, S. **The coming age of probiotics.***Trends Food Sc. Technol.*, v. 6, p. 241-245. 1995.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. **Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System?** *Science*, v. 330, p. 1768-1773. 2010

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. **Handbook of Probiotics and Prebiotics.** 2 ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc., p.174. 2009

LEBEER, S. *et al.* **Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 4, p. 728, 2008.

LESLIE SB, ISRAELI E, LIGHTHART B, CROWE JH, CROWE, L. M. **Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.** *Appl Environ Microbiol.* 61, 3592-3597. 1995.

LI, B., TIAN, F., LIU, X., ZHAO, J., ZHANG, H., CHEN, W. **Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC 6226.***Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 609-616. 2011.

LIAN, W.-C., HSIAO, H.-C., & CHOU, C.-C. **Survival of bifidobacteria after spray-drying.** *International Journal of Food Microbiology*, 74, 79–86. 2002.

LIEVENSE, L.C., VERBEEK, M.A.M., NOOMEN, A. VAN'T RIET, K. **Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, p.90-94. 1994.

LIN, W.H., *et al.* **Antimicrobial susceptibility different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry.** *Anaerobe*, Amsterdam, v.13, p.107-113, 2007.

LIN, C.W., CHEN, H.L., LIU, J.R. **Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan.** *Aust. J. Dairy Technol.* 54, 14-18, 1999.

LIMA, D. T. **Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas.** 120p. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. 2011

LIU, J., A, P., MOON, N. J. **Kefir a “new” fermented milk product.** *Cult.Dairy Prod. J.* 83, p.11-12. 1983.

MACK, D.R., ARHNE, S., HYDE, L., WEI, S. HOLLINGSWORTH, M.A. **Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal cells *in vitro*.** *Gut*, 52, p.827–833. 2007

MAGALHÃES, M. F. **Tempo de trânsito colônico.** In: Castro LP, Coelho LGV, editores. *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda.; p. 1445-9, 2004.

MANGONI, J. **Potencial Probiótico de Lactobacilos de origem suína.** 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

MARTINS, A.D.O *et al.* **Resistência de bactérias lácticas isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores.** *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.5, n., p.53-59, 2006.

MARTINS, F.S. ; BARBOSA, F.H.F. ; CARA, D.C. ; ROSA, C.A. ; PENNA, F.J. ; NEVES, M.J. ; NICOLI, J.R. . **Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos** contendo *Saccharomycesboulardii* ou *Saccharomycescerevisiae*. *HigieneAlimentar*, v. 21, p. 460-461, 2007.

MARSHALL ,V. M. **Starter cultures for milk fermentation and their characteristics.** *Journal of the Society of Dairy Technology*.46, 49-56, 1993.

MATSUGUCHI, T.; TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; *et al.* **Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2.** *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 10, p. 259–66, 2003.

MERYMAN, H.T. **Freezing injury and its prevention in living cells,** *Annu. Rev. Bioph. Bioeng.* 3:341-363. 1974

MICHELI L., UCCELLETTI D., PALLESCHI C., CRESCENZI V. **Isolation and characterisation of a rophy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharidekefiran.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 69-74. 1999.

MITAL, B. K., GARG, S. K. **Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*.** *Clin. Rev. Microbiol.* 21, 175-214. 1995.

MOREIRA J. L. S., MOTA R. M., HORTA M. F., TEIXEIRA S. M., NEUMANN E., NICOLI J. R., NUNES A. C. **Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling.** *BMC Microbiology* 5(1): 15, 2005.

MORGAN, C. A., HERMAN, N., WHITE, P. A., VEZEY, G. **Preservation of microorganisms by drying: a review.** *Journal of Microbiological Methods.* 66 183-193. 2006.

MOURA L. N., NEUMANN E., VIEIRA L. Q., NICOLI J. R., **Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice,** *Braz J of Microbiol.*,32, 66-69. 2001.

MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

NADER-MACIAS, M. E. F. *et al.* **Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, n. 11, p. 1387-1395, 2008.

NAGIRA T., NARISAWA J., TERUYA K., KATAKURA Y., SHIM S., KUSUMOTO K., TOKUMARU S., TOKUMARU K., BARNES D.W. SHIRAHATA S. **Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir.** *Cytotechnology*, 40, 125–137. 2002.

NARDI, R. M. D., SANTOS, A. R. M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L.M., BENCHETRIT, L. C., NICOLI, J. R. **Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. Isolated from the rat fecal microbiota.** *Anaerobe*(London).London, v.5. p. 409-411. 1999

NARDI *et al.* **Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1.** *Journal of Applied Microbiology*. V. 99, p. 649-656, 2005.

NASH, T. **Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing.** In: Meryman, H. T. *Cryobiology*. New York: Academic Press. 1966

NEUMANN, E. **Comportamento *in vitro* de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocinas sob condições do trato digestivo.** 86 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

NEUMANN, E., FERREIRA, C. L. F. ***Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: *in vitro* susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutics.** *Rev. Microbiol.* 26: 57-62, 1995.

NEUMANN, E., OLIVEIRA, M.A.P., PÉRET, L.A., UETANABARO, A.P., VIEIRA, L.Q., NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C. AND PODOPRIGORA, G.I. **Probiotics stimulate the mononuclear phagocyte system of mice.** In *Germfree life and its ramifications* ed. Hashimoto, K. *et al.* pp. 269-274. Shiozawa; Sense Printing Ltda, 1996.

NEUMANN E., OLIVEIRA M. A., CABRAL C. M., MOURA L. N., NICOLI J. R., VIEIRA E. C., CARA D. C., PODOPRIGORA G. I., VIEIRA L. Q. **Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice,** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31, 1565-1573. 1998.

NEUMANN E., RAMOS M. G, SANTOS L. M., RODRIGUES A. C., VIEIRA E. C., AFONSO L. C., NICOLI J. R., VIEIRA L. Q. ***Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 induces type 1 cytokine production by mouse cells *in vitro* and *in vivo*,** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42, 358-367. 2009.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S.C. **Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances.** *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

NICOLI, J.R., RAIBAUD, P. ***In vivo* and *in vitro* antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp from human intestinal flora in mice.** *Microecol. Therap.*, 20: 141-146. 1990.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. **Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde.** In: Castro, L. P.; Coelho; L. G. V. (Org.). *Gastroenterologia*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 1037-1047. 2004.

NIVOLIEZ, A; CAMARES, O; PAQUET-GACHINAT, M; BORNES, S; FORESTIER, C; VEISSEIRE, P. **Influence of manufacturing process on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr 35®.** *Journal of Biotechnology*, 160. 236-241, 2012.

O'CALLAGHAN, J., & CONDON, S. **Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: Correlation with the ability to accumulate glycine and betaine.** *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 127-131. 2000.

OELSCHLAEGER, T. A. **Mechanisms of probiotic actions – a review.** *International Journal of Medical Microbiology*, Amsterdam, v.300, p.57-62, 2010.

OLIVEIRA, E.C.S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino.** Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) -Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 61f. 2003.

ORLANDO, A., MESSA, C., LINSALATA, M., CAVALLINI, A., RUSSO, F. **Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric on DLD-1 colonic cancer cell lines.** *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31, p.108-116. 2009.

OTERO, M. A., ESPECHE, M. C., NADER-MACIAS, M. E. **Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications.** *Process Biochemistry*. 42, 1406-1411. 2007.

PACHECO, K.C.; TORO, G.V.; MARTINEZ, F.R.; DURÁN-PÁRAMO, E. **Viability of *L. delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated *in vitro*.** *American J. of Agricultural and Biological Sciences*, 1:37-42, 2010.

PÁEZ, R., LAVARI, L., AUDERO, G., CUATRIN, A., ZARITZKY, N., REINHEIMER, J., VINDEROLA, C.G. **Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli.** *International Journal of Dairy Technology*, v. 66, p. 155-161, 2013.

PLANT, L.; CONWAY, P. **Association of lactobacillus spp. With Peyer's patches in mice.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(2), 320-324. 2001.

PEHKONEN, K.S., ROOS, Y.H., MIAO, R.P., STANTON, C. **State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG).** *Journal of Applied Microbiology*, p.1732-1743. 2008.

PEIGHAMBARDOUST, S.H; TAFTI, A.T; HESORI, J. **Application of spray-drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review.** *Trends in Food Science & Technology*, 22. 216-224. 2011.

PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P., BELLON-FONTAINE, M.N. **Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains.** *Appl Environ Microbiol*, 63(5): 1725-1731, 1997.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; VINTIÑI, E.; ROUX, E. **Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus.** *Int. J. Immunol. Pharmacol.*, v. 12, p. 97-102, 1999.

PEREZ, P. F., MINNARD, Y., DISALVO, E. A., ANTONI, G. L. **Surface properties of bifidobacterial strains of human origin.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 21-26. 1998

PILLAI, A., NELSON, R.L. **Probiotics for treatment of *Clostridium difficile* associated colitis in adults.** *Intervention Review*, p. 1-18. 2008.

PITINO, I., RANDAZZO, C. L., MANDALARI, G., LO CURTO, A., FAULKS, R. M., LE MARC, Y., BISIGNANO, C., CAGGIA, C., WICKHAM, M. S. J. **Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract.** *Food Microbiology* 27: 1121–1127. 2010

PLEASANTS, R. R. Gnotobiotics In: Melby Jr, E. C., ALTMANN, N. H. **Handbook of Laboratory Animal Science.** Cleveland, C.R.C press, p. 119-174, 1974.

PRISTA, L.N. & ALVES, A.C. **Tecnologia Farmacêutica.** Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996

RAMARE, F., NICOLI, J. R., DABARD, J., CORRING, T., LADIRE, M., GUEUGNEAU, A., RAIBAUD, P. **Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and *in vitro*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2876-2883. 1993.

RIZZELLO, V., BONACCORSI, I., DONGARRÀ, M. L., FERLAZZO, G. **Role of natural killer cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 1-10. 2011

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M.; *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, 404. 2005.

ROSA, E.D.; TSUKADA, M; FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, 1-10. 2003.

RYBKA, S., FLEET, G.H. **Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts.** *Food Aust.*, Sydney, v.49, n.10,p.471-475, 1997

SAARELA, M. *et al.* **Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.** *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SALMINEN S, BOULEY C, BOUTRON-RUAULT MC. **Functional food science and gastrointestinal physiology and function.** *Br J Nutr* ;80: 147–71. 1998

SALMINEN S., VON WRIGHT A., MORELLI L., MARTEAU P., BRASSART D., DE VOS W.M., FONDEN R., SAXELIN M., COLLINS K., MOGENSEN G., BIRKELAND S.E., MATTILA SANDHOLM T. **Demonstration of safety of probiotics – a review.** *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93–106. 1998.

SALOFF-COSTE C.J. **Kefir, Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks.** *Danone World Newsletter*.111-17. 1996.

SANTIVARANGKNA, C., KULOZIK, U., FOERST, P. **Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes.** *Journal of Applied Microbiology*. 105, 1-13. 2008.

SANTIN, T. R., BLUME, H., MONDADORI. **Criopreservação de embriões – Metodologias de vitrificação.** *Vet e Zootec*, 16. 561-574. 2009

SANTOS, L. M., SANTOS, M., SOUZA SILVA, H.P., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J.R., VIEIRA, L.Q. **Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection.** *Medical Microbiology and Immunology*, v. 200, p. 29-38, 2011.

SARKAR, S. **Biotechnological innovations in kefir production: a review.** *British Food J.*, 110(3). 283-295, 2008.

SCHNEEDORF, J. M., ANFITEATRO, D., **Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação.** Tecmedd. São Paulo. 2004.

SCHNEITZ C., NUOTIO L., LOUNATMA K. 1993.**Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer).***Journal of Applied Bacteriology*, 74, 290–294. 1993.

SCHOUG, A., OLSSON, J., CARLFORS, J., SCHNÜRER, J, HÅKANSSON, S. **Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis*Si3 – effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties.***Cryobiology*.53, 119–127. 2006.

SELMER-OLSEN, E., BIRKELAND, S. E., SORHAUG, T. **Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration.***Journal of Applied Microbiology* 87, 429–437. 1999.

SEMYONOV, D., RAMON, O., KAPLUN, Z., LEVIN-BRENER., L., GUREVICH, N., SHIMONI, E. **Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying.***Food Research International*. 43, 193-202. 2010

SILVA, S. H., VIEIRA, E. C., DIAS, R. S., NICOLI, J. R. **Antagonism against *Vibrio cholerae* by a diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota.** *J. Med. Microbiol*, 50: 161-164. 2001

SILVA, M. E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais.** Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1986 (Dissertação, Mestrado).

SILVA, B. C. ; JUNG, L. R. ; SANDES, S. H. C. ; ALVIM, L. B. ; BOMFIM, M. R. Q.; NICOLI, J. R. ; NEUMANN, E. ; NUNES, A. C. . ***In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics.** Beneficial Microbes **JCR**, v. 1, p. 1-9, 2013.

SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, T., FRENGOV, A. G., SPASOV, Z. **Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 281-6, 2002.

SOUZA, M. R. **Identificação molecular e propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de cecos de gallu gallus domesticus "caipira" e de granja.** 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SINGH, K., KALLALI, B., KUMAR, A., THAKER, V. **Probiotics: a review.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 287-290. 2011

SINSKEY, T.J. SILVERMAN, G.J. **Characterization of injury- incurred by Escherichia coli upon freeze-drying.** *Journal of Bacteriology* 101, 429437. 1970.

SPENCER, R. J., CLESSON, A. **The effect of *Lactobacillus sp.* on the attachment of enterotoxigenic *E. coli* isolated porcine enterocytes.** *J. Applied Bacteriol.* 77, 215. 1994.

STEINBERG, R.S. **Avaliação da capacidade imunomodulatória de isolados de *Lactobacillus* bovinos (L38 e L36) em modelo experimental murino desafiado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium** 2012. 141f. Dissertação (mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ST-ONGE, M.P., FARNWORTH, E.R., SAVARD, T., CHABOT, D., MAFU, A., JONES, P.J. **Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial.** *BMC Complement. Altern. Med.* 2, 1-7. 2002.

STRASSER, S., NEUREITER, M., GEPPL, M., BRAUN, R., DANNER. **Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria.** *Journal of Applied Microbiology*. 167-177. 2008.

STROMPFOVA, V. *et al.* **Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs.** *Anaerobe*, v. 12, n. 2, p. 75-79, Apr 2006.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. **Encapsulation of probiotic bacteria with alginate- starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

SZAJEWSKA, H., VONKE, M., PATRO, B. **The effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children.** *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 34, p. 1079-1087. 2011.

SUMITA, T.C. **Caracterização probiótica de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas.** 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.

TAHMOURESPOUR, A. *et al.* **The relationship between cell surface hydrophobicity and antibiotic resistance of streptococcal strains isolated from dental plaque and caries.** *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Mashhad, v.10, n.4, p.251-255, 2008

TAKIZAWA, S., KOJIMA, S., TAMURA, S., FUJINAGA, S., BENNO, Y., NAKASE, T. **The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains.** *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 121–127.1998.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. **Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food.** *Anton. van Leeuw. Jour.*, v. 76, n.1-4, p. 115-137, 1999.

THOREUX, K., SCHMUCKER, D.L. **Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats.** *Journal of Nutrition*, 131, 807–812, 2001.

TO, B. C. S., & ETZEL, M. R. **Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species.** *Journal of Food Science*, 62, 576-585. 1997.

TRONCON, L.E.A. **Motilidade gástrica: fisiopatologia e métodos de estudo.** *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*, vol.2, p.14-25. 2008

TURNER, J.L.; DRITZ, P.S.S.; MINTON, J.E. **Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets.** *The professional animal scientist*, n.17, p.217-226, 2001.

TSVETKOU, T., BRANKOVA, R. **Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of cryoprotectants.** *Cryobiology*, 318-323. 1983

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. **DNA based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species.** *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 28, n. 5, p.430-441, 2005.

VELRAEDS, M. M. C., MEI, H. C., REID, G., BUSSCHER, H. J. **Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates.** *Appl. Environm. Microbiol.* 62, 1958-1963. 1996.

VIGNOLO, G. M., SURIANI, F., RUIZ HOLGADO, A. P., OLIVER, G. **Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages.** *J. Appl. Bacteriol.* 75, 344-349. 1993.

VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. **Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products.** *Int.Dairy J.*, Amsterdam, v.10, n.4, p.271-275, 2000

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. **Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barriers resistance.** *Food Research International*, v. 36, p. 895-904, 2003.

VINDEROLA, C. G., MATAR, C., PERDIGON, G. **Role of Intestinal Epithelial Cells in Immune Effects Mediated by Gram-Positive Probiotic Bacteria: Involvement of Toll-Like Receptors.** *Clin.Diag, Labor. Immunol.*, 12(9): 1075-1084. 2005.

VINDEROLA, C.G ; PERDIGÓN, G ; DUARTE, J ; FARNWORTH, E ; MATAR, C . **Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation.** *Journal of Dairy Research*, v. 73, p. 472, 2006.

VINDEROLA, C.G., PERDIGÓN, G., DUARTE, J., THANGAVEL, D., FARNWORTH, E., MATAR, C. **Effects of kefir fractions on innate immunity.***Immunobiology*211, 149–156. 2006.

WAGMAN, J. **Evidence of cytoplasmic membrane injury in the drying of bacteria.** *Journal of Bacteriology*, 80, p. 558-564. 1960.

WALKER D.K., GILLILAND S.E. **Relationships among bile tolerance, bile salt desconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.** *J Dairy Sci*, 76:956-961, 1993.

WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T.J. **Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains.***Int. J. Dairy Technol.* 57, 33-37. 2004.

WOLFE, J. & BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** *Int J Refrig.* 24:438-450. 2001.

ZACCONI, C., PARISI, M.G., SARRA, P.G., DALLAVALLE, P. **Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks.** *Microbiol Aliments Nutrition*, 12, 387–390. 1995.

ZAMORA, L.M., CARRETERO, C. AND PARES, D. **Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying.** *Food Sci Technol Int* 12, 77–84. 2006.

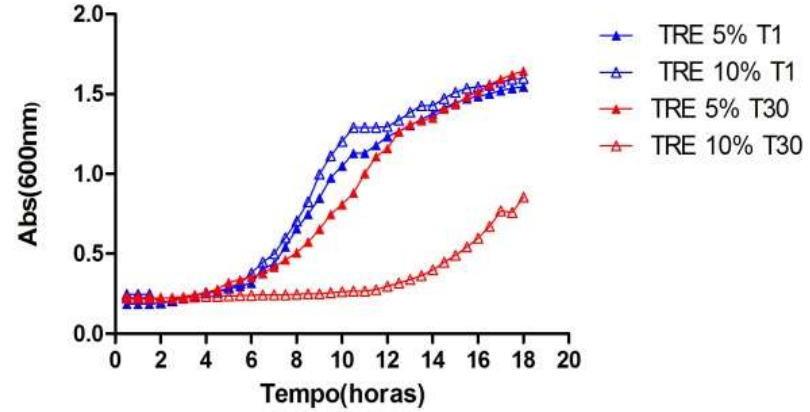
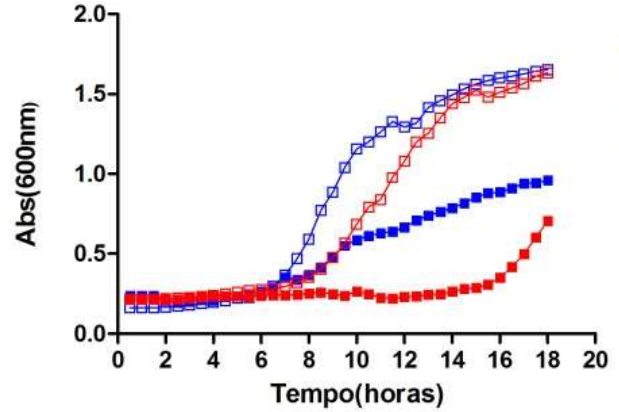
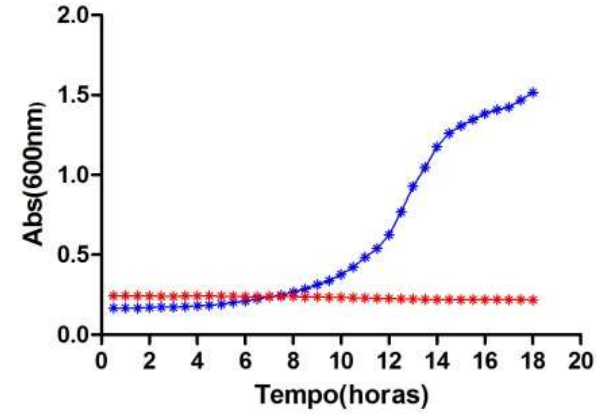
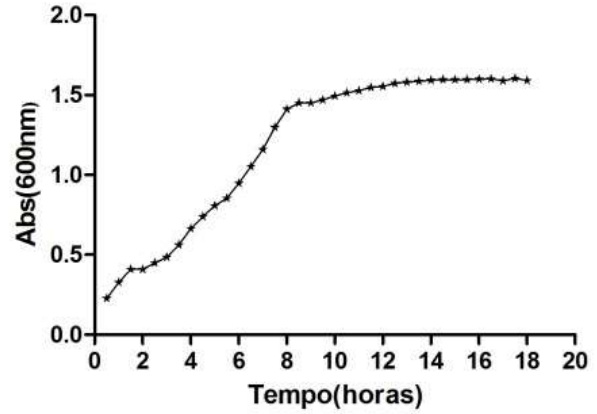
ZANIRATI, D. F. **Caracterização da microbiota associada a grãos de kefir por métodos dependentes e independentes de cultivo.** 2012. 90 f. Dissertação (mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, 2012;

ZHENG, Y., LU, Y., WANG, J., *et al.* **Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains.** *Plos one.* July, vol.8, 1-8. 2013.

ZHOU, J.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Inter. Jour. Food Microbiol.*, v. 98, p. 211-217, 2005.

25P-L

(Continua)



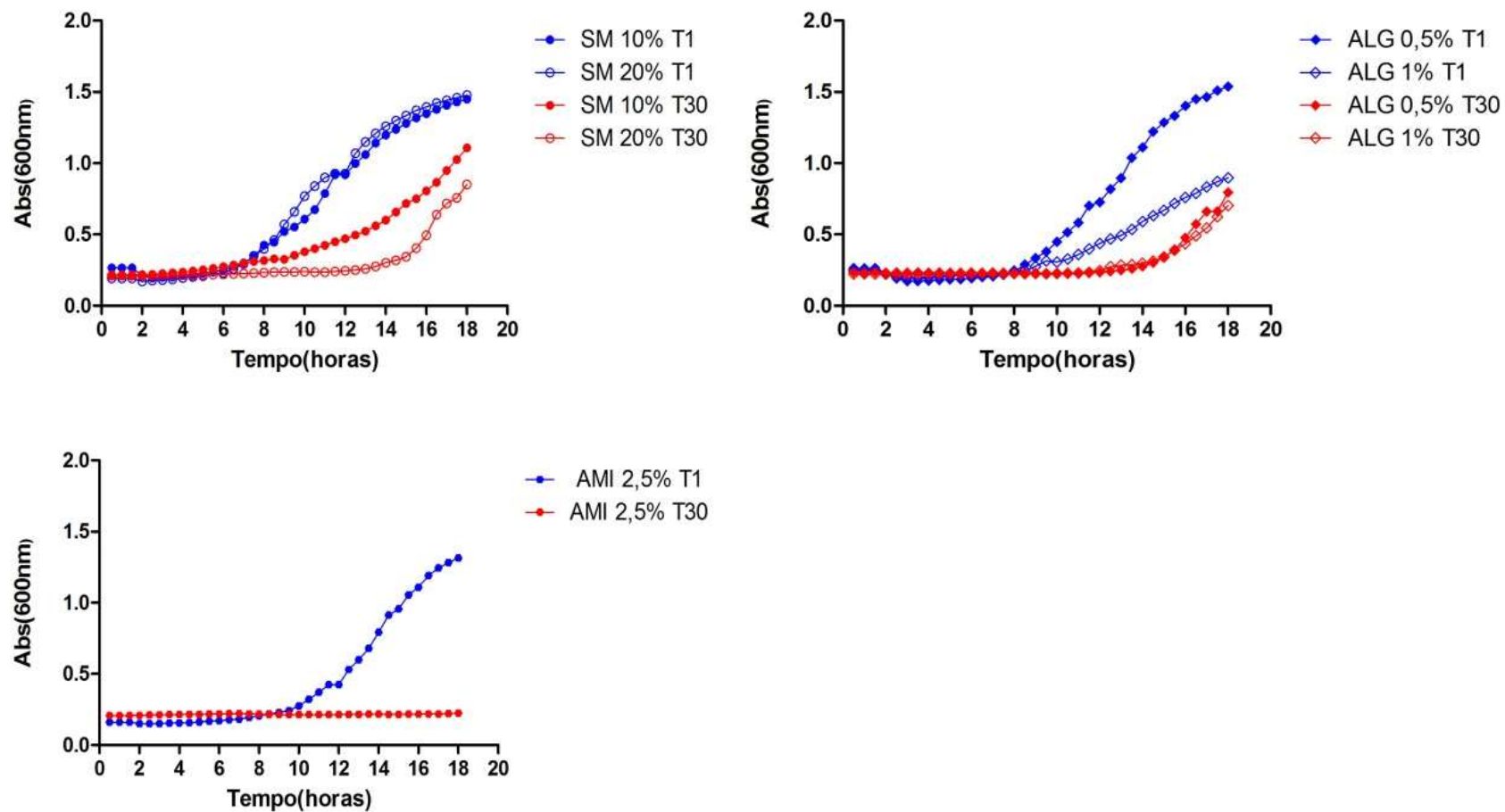
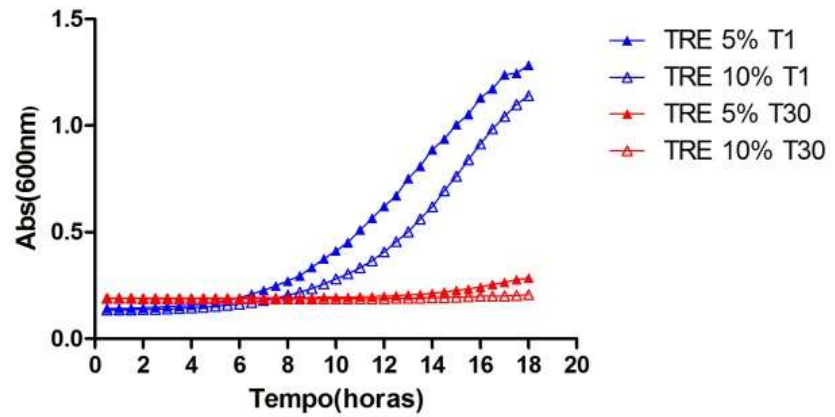
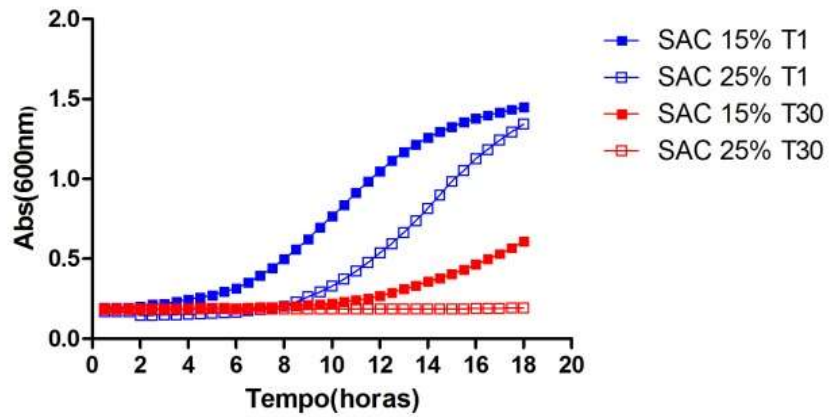
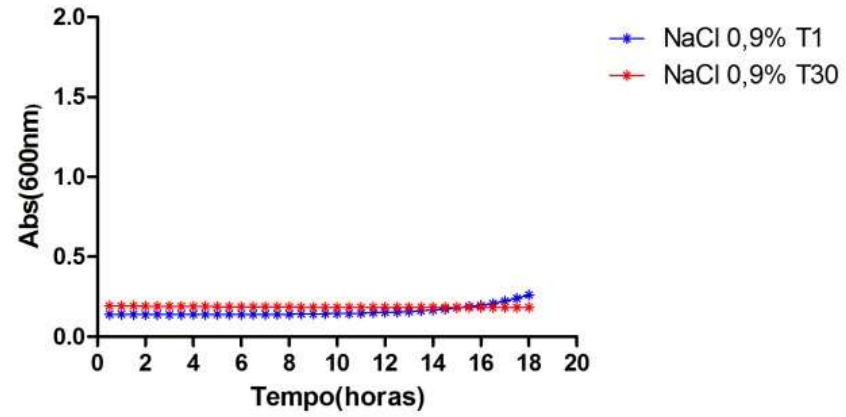
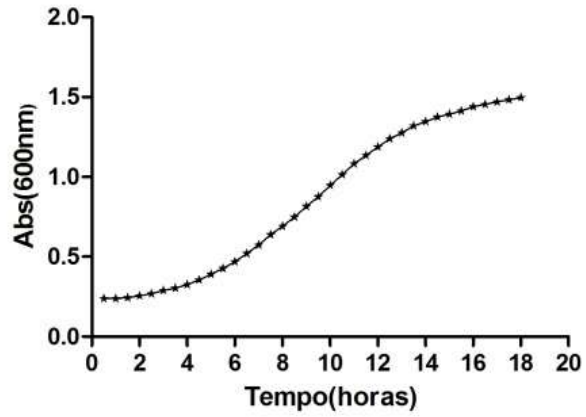


Figura 13. Cinética de reativação de *Lactobacillus casei* 25P-L em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,003 e 0,112.

17U-A

(Continua)



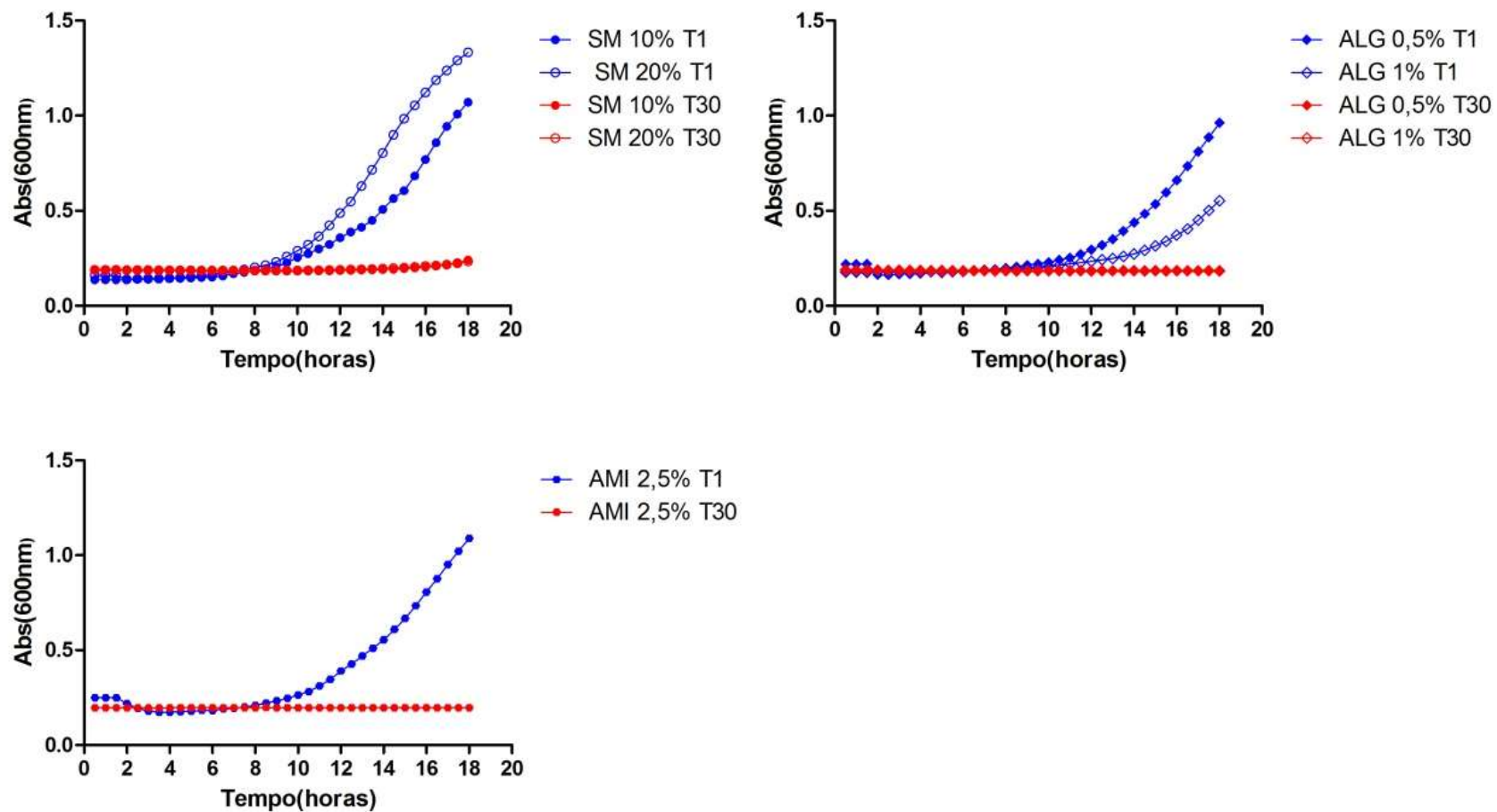
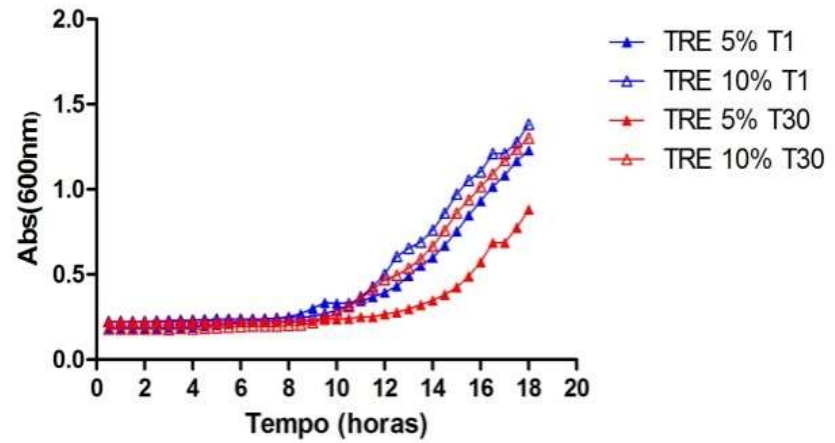
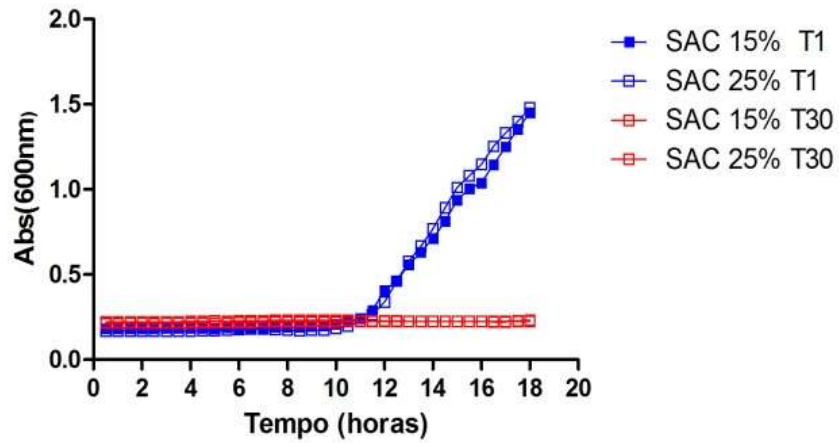
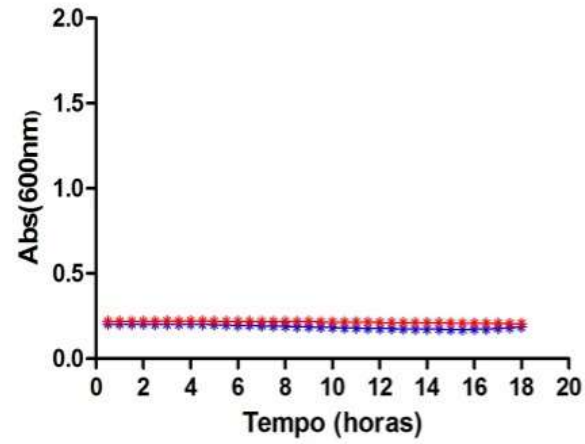
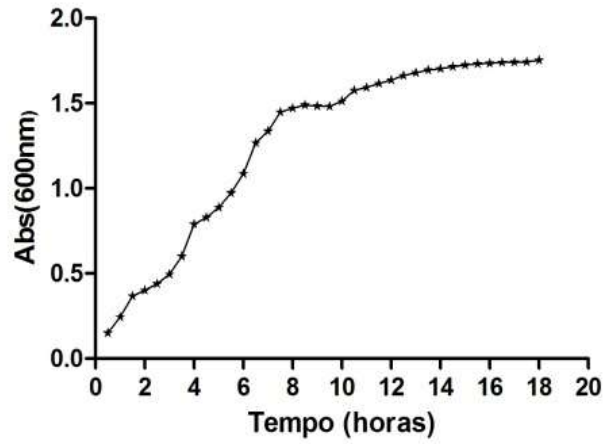


Figura 14. Cinética de reativação de *Lactobacillus casei* 17U-A em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,006 e 0,047.

11P3-A

(Continua)



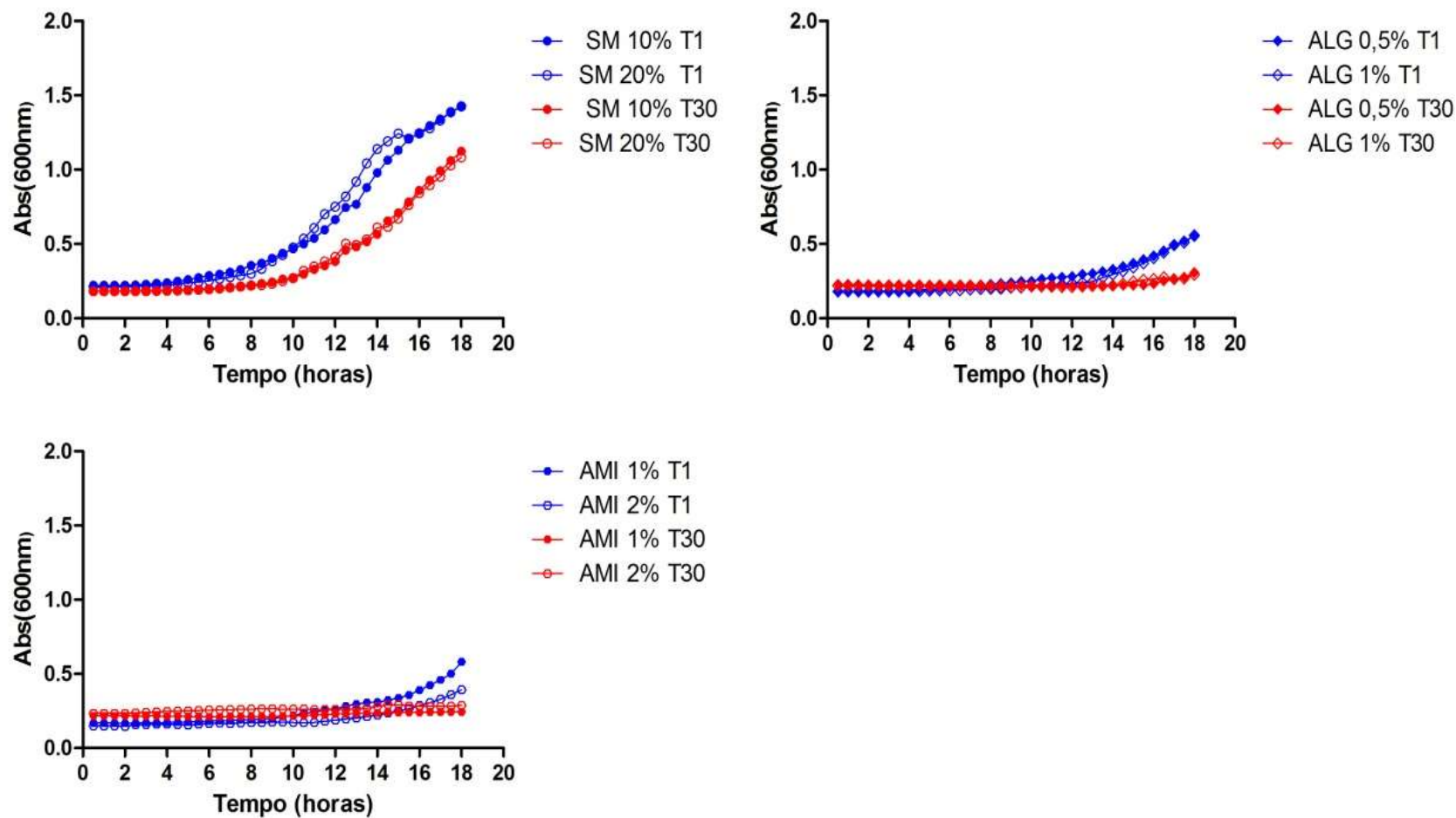
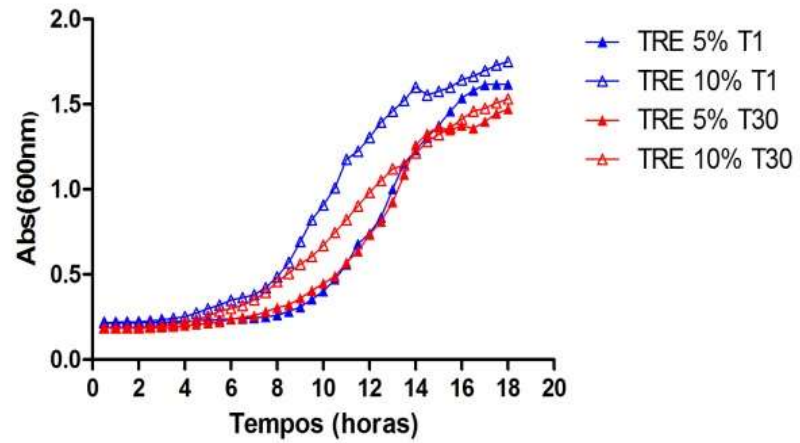
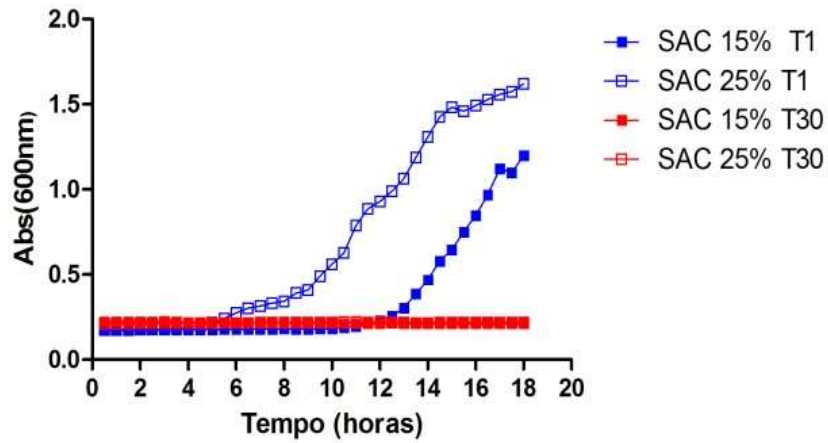
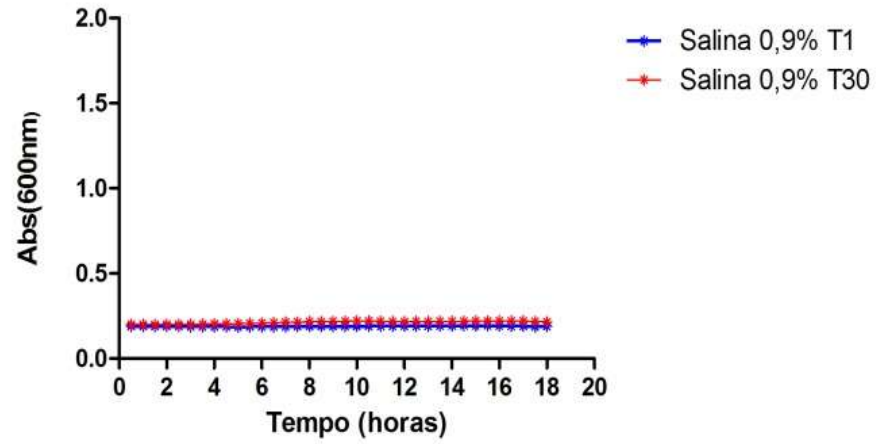
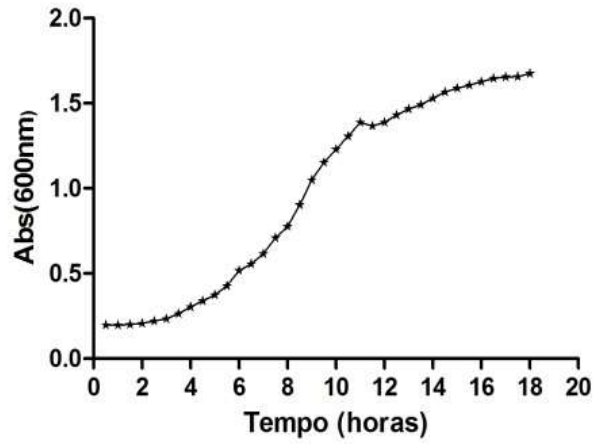


Figura 15. Cinética de reativação de *Lactobacillus perolens* 11P3-A em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,002 e 0,047.

17P2-A

(Continua)



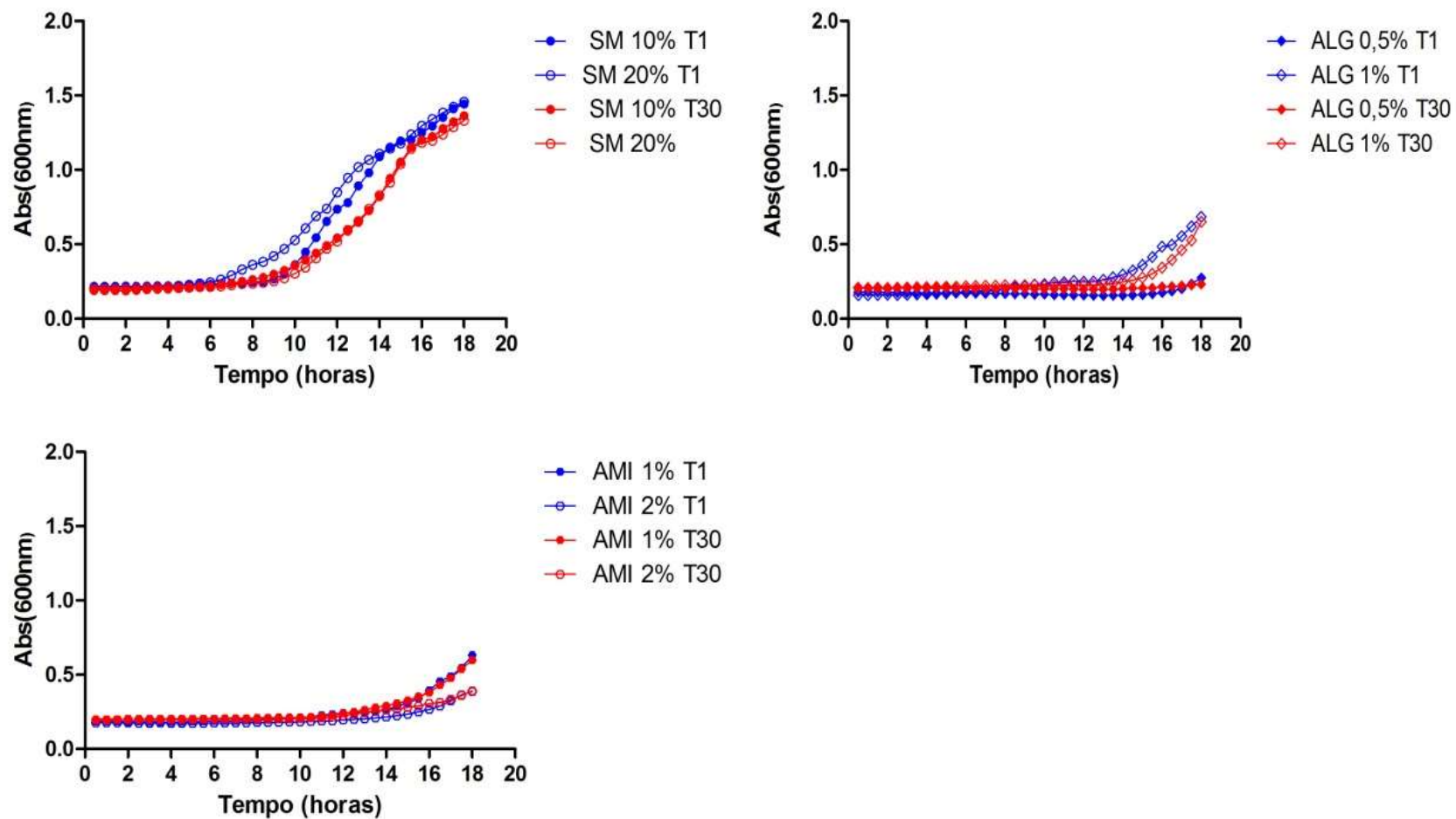
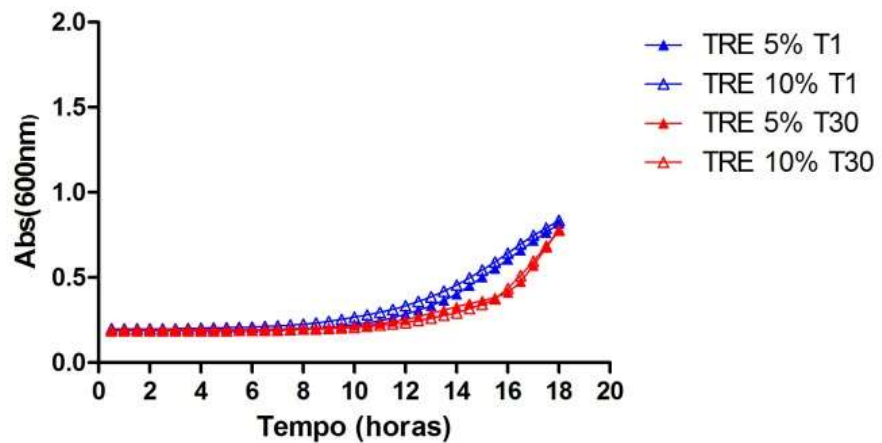
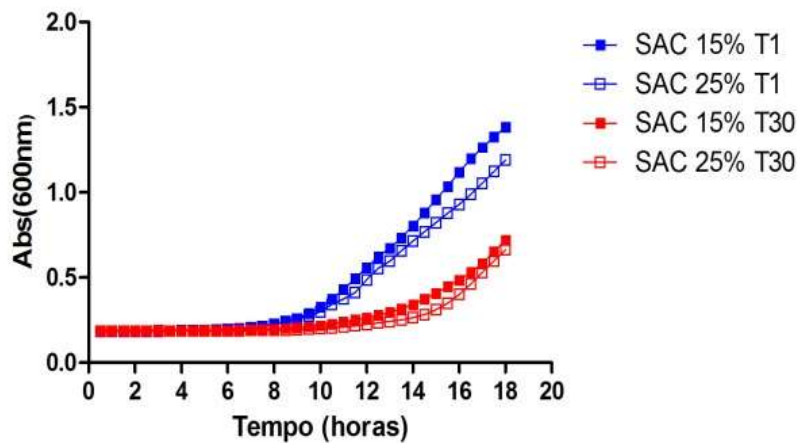
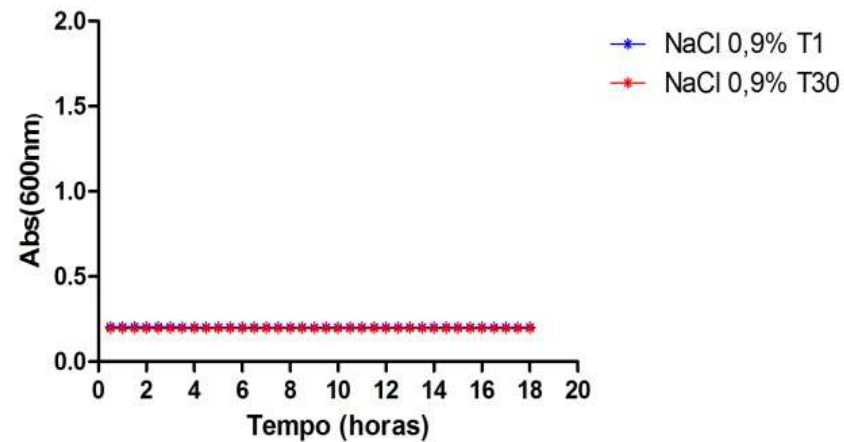
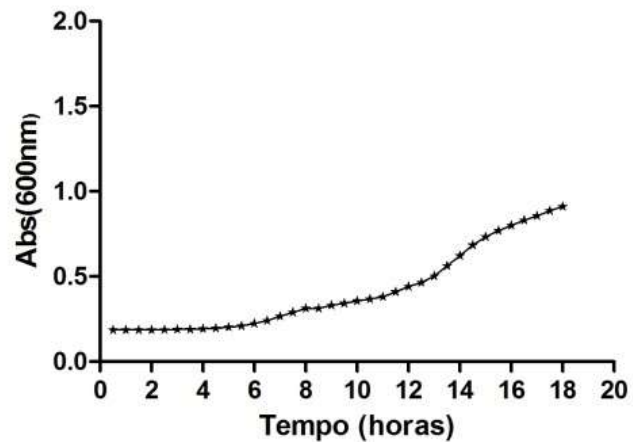


Figura 16. Cinética de reativação de *Lactobacillus perolens* 17P2-A em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,005 e 0,117.

21U2-A

(Continua)



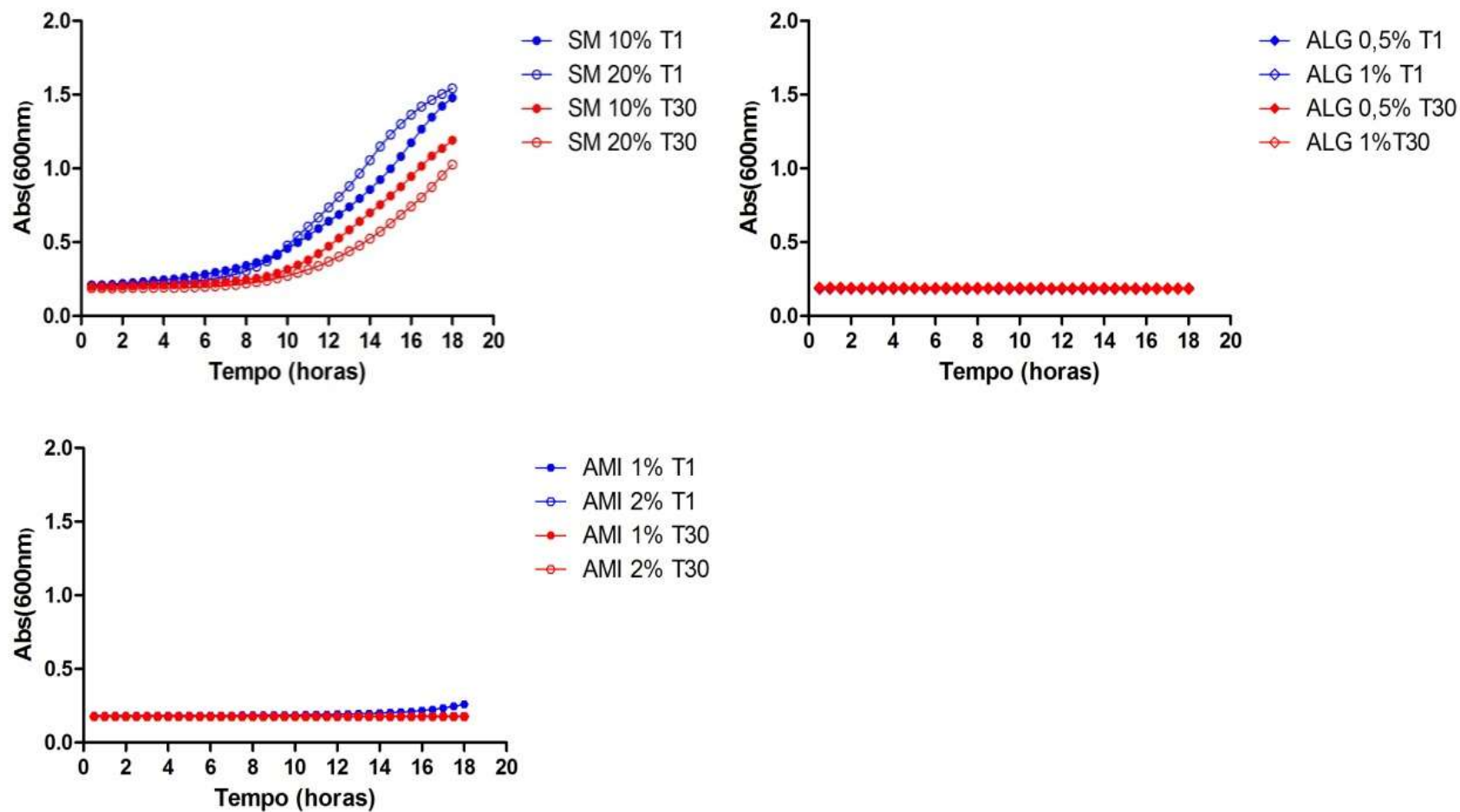
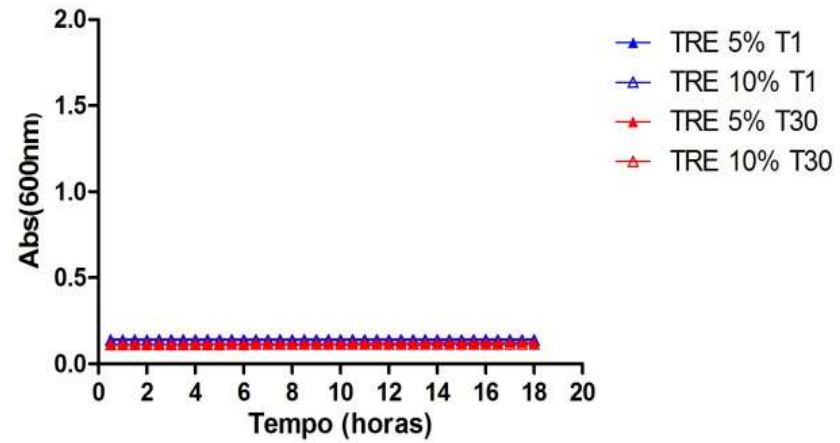
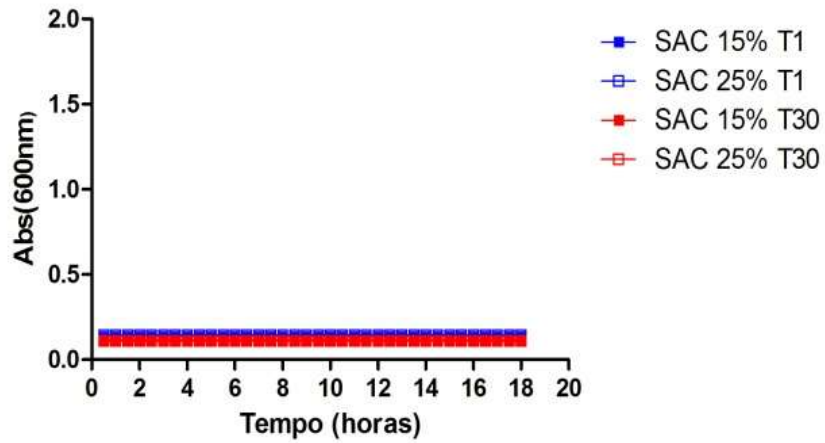
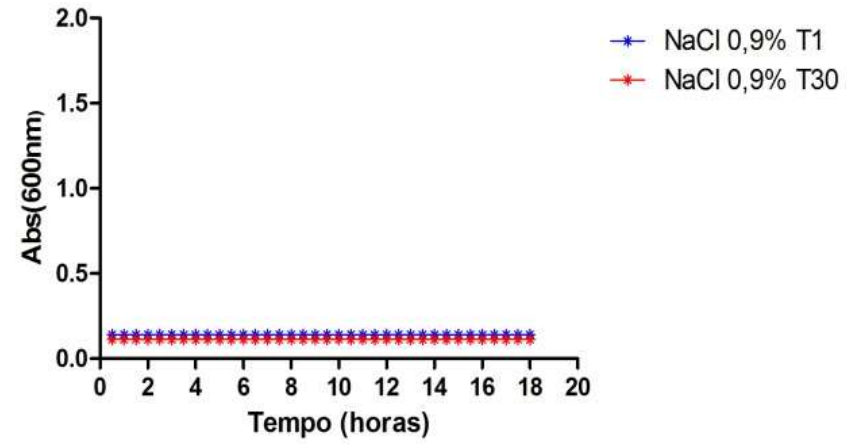
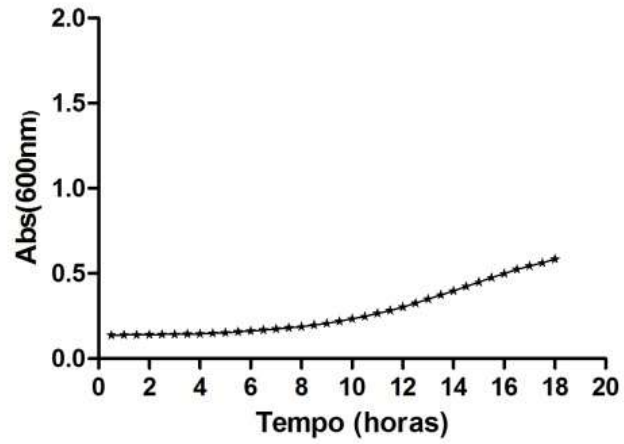


Figura 17. Cinética de reativação de *Lactobacillus mali* 21U2-Aem em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,001 e 0,188.

(Continua)

24P3I-L



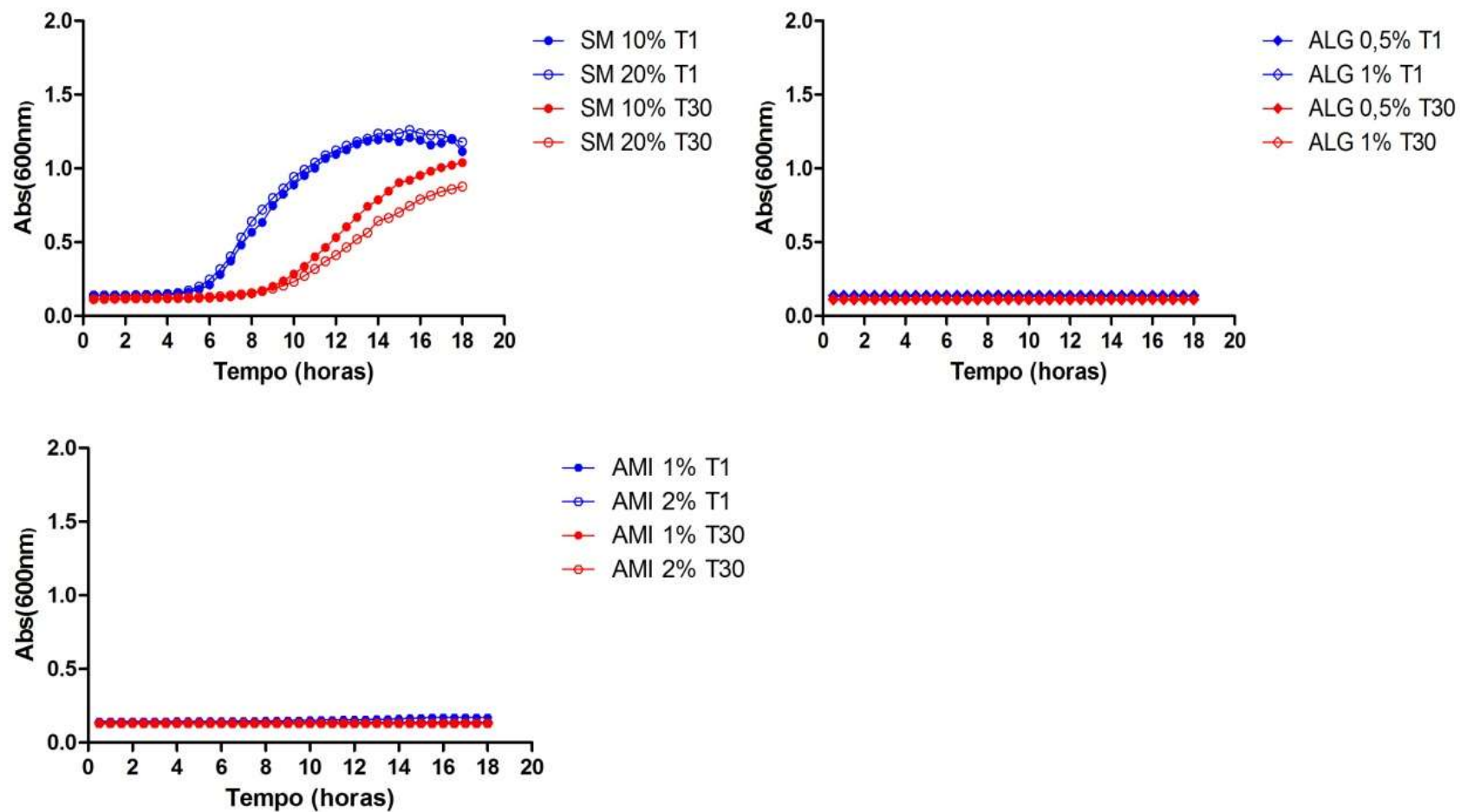
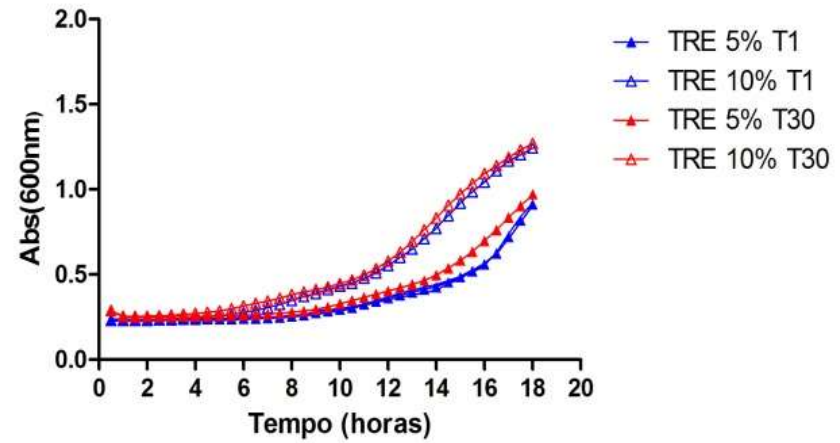
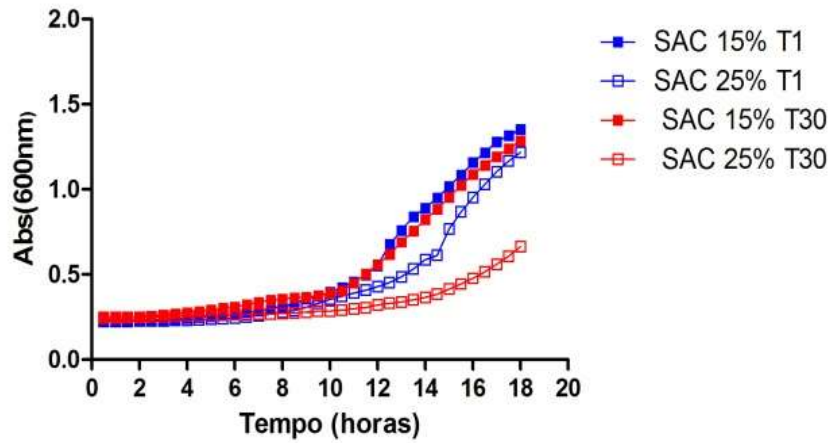
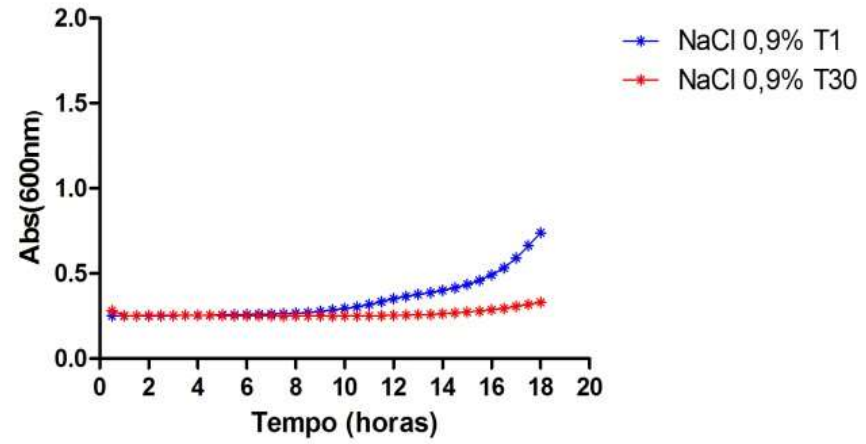
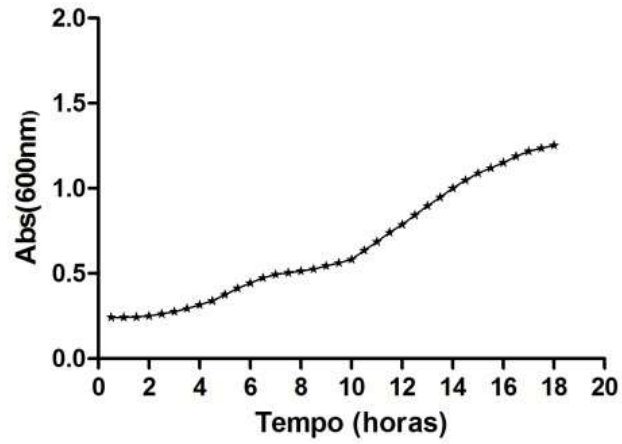


Figura 18. Cinética de reativação de *Lactobacillus kefir* 24P31-Lem caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,001 e 0,064.

8U-L

(Continua)



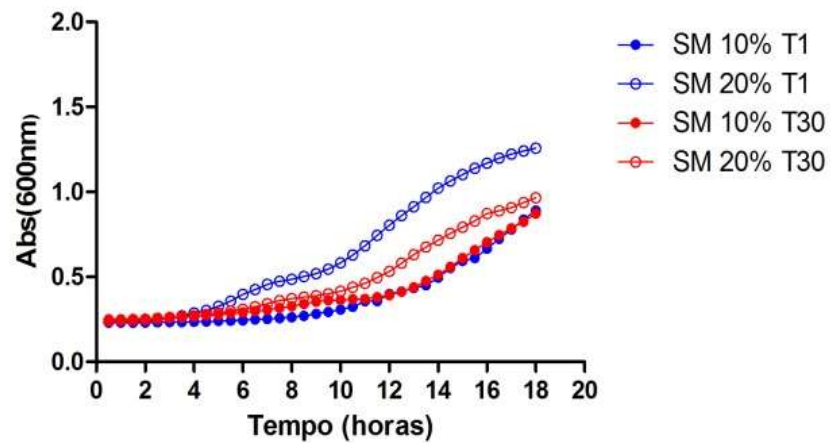
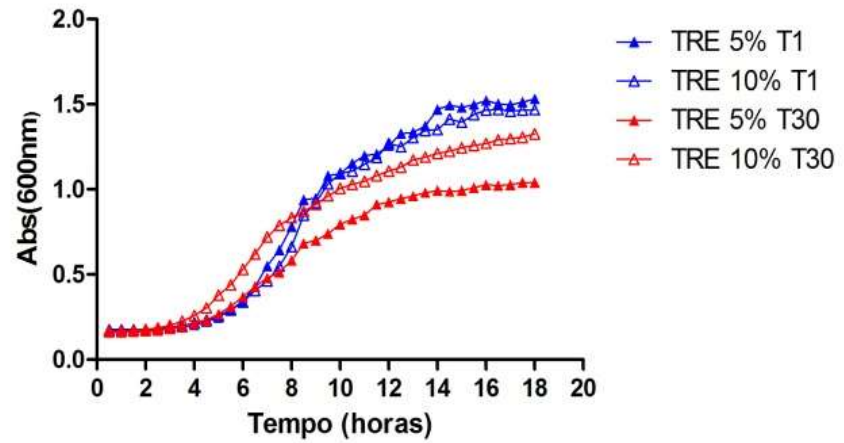
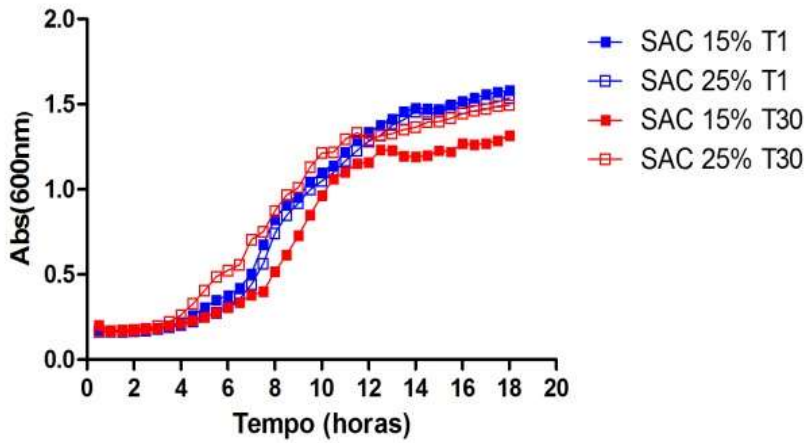
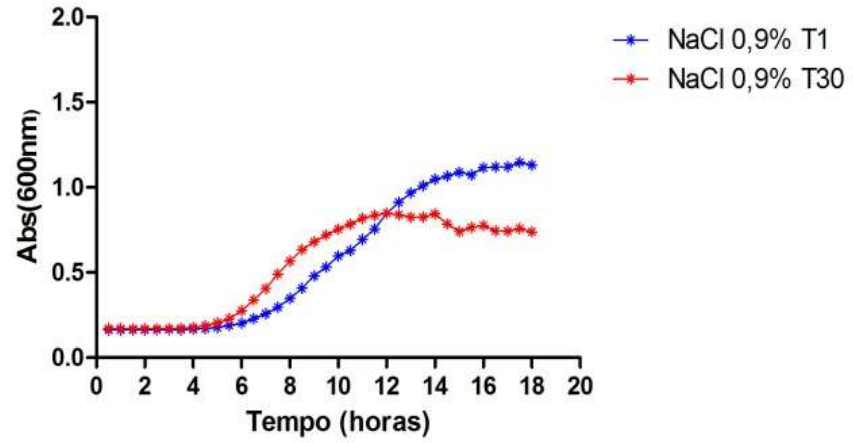
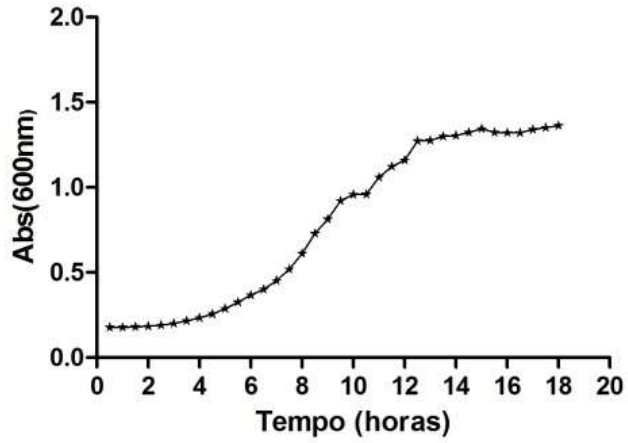


Figura 19. Cinética de reativação de *Lactobacillus kefiranofaciens* 8U-L em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,006 e 0,211.

1Z-A

(Continua)



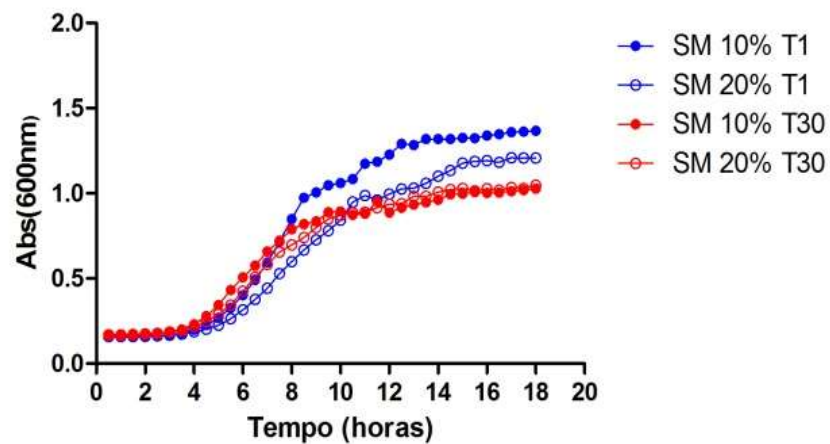
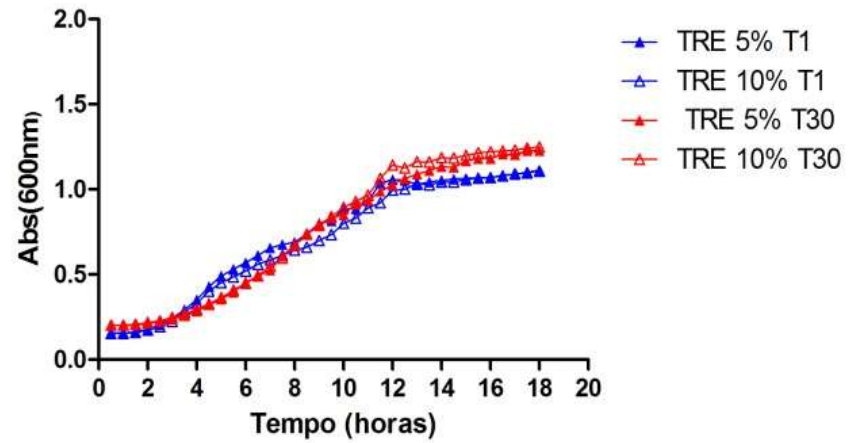
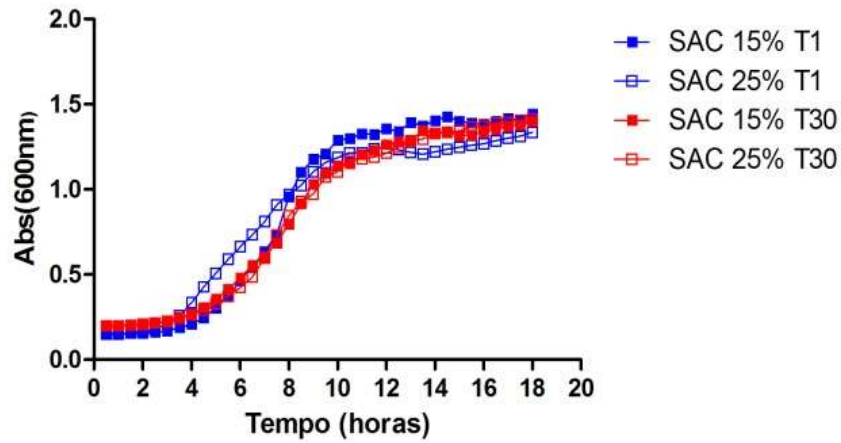
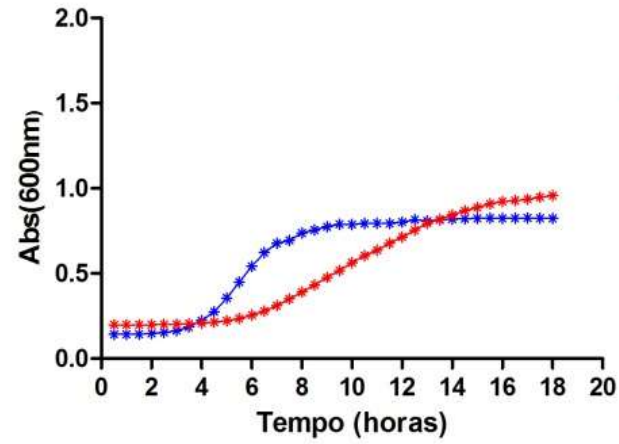
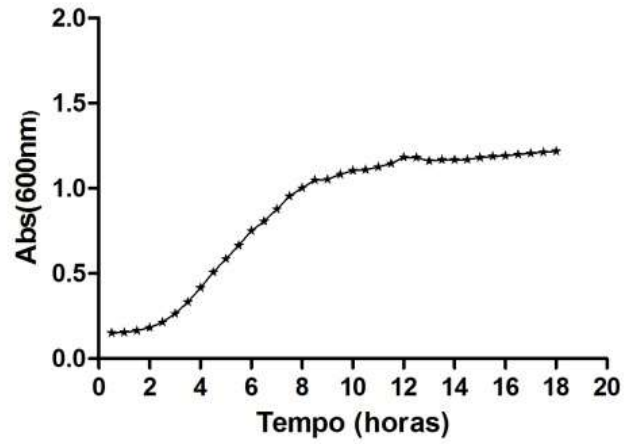


Figura 20. Cinética de reativação de *Lactobacillus diolivorans* 1Z-A em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,005 e 0,073.

18P-A

(Continua)



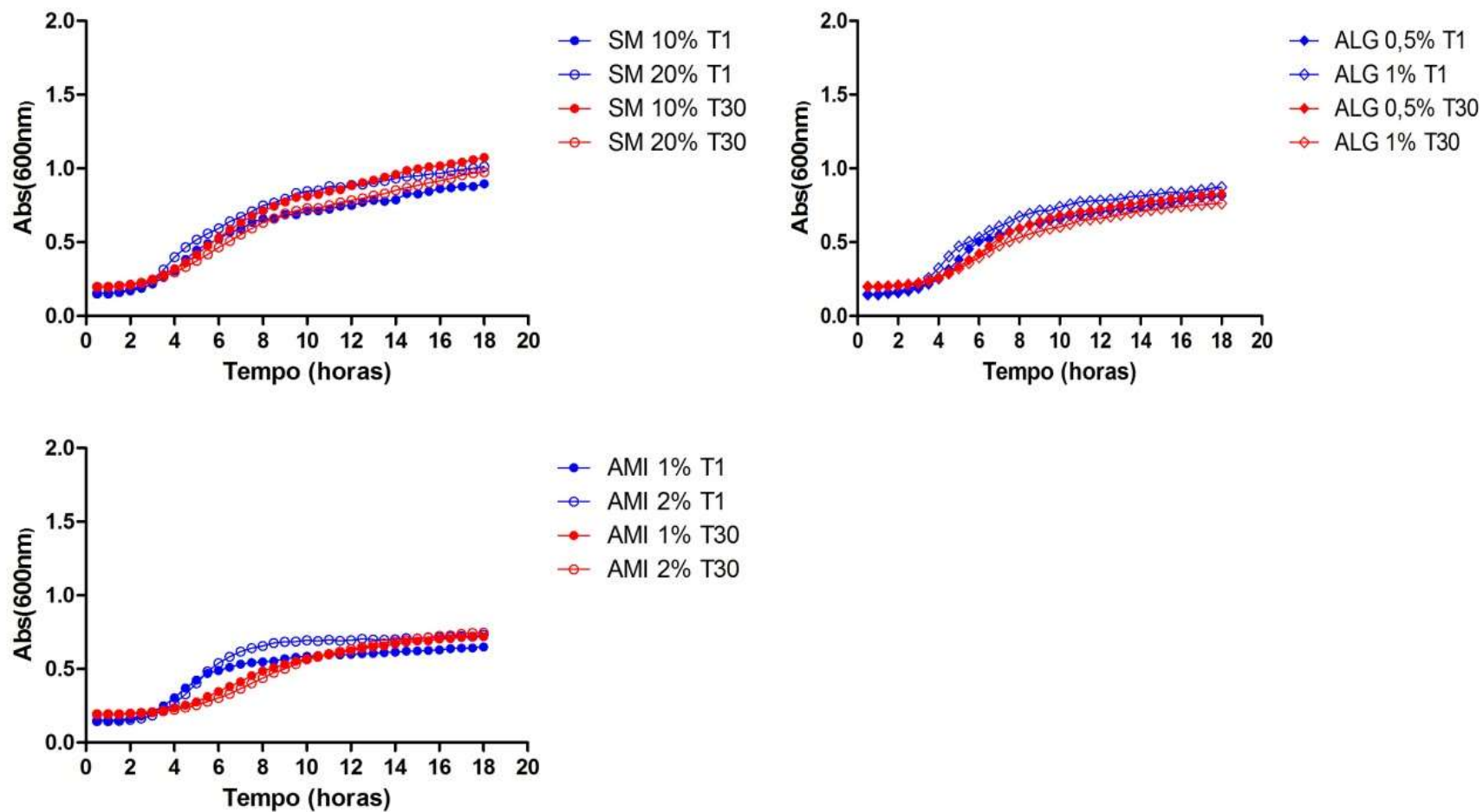
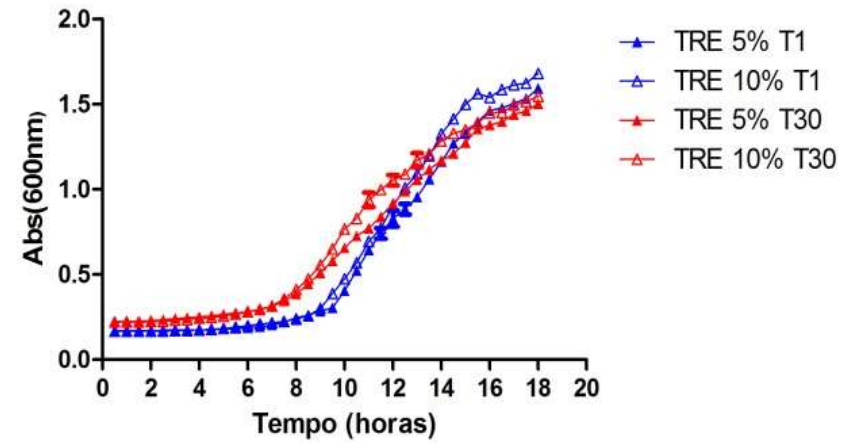
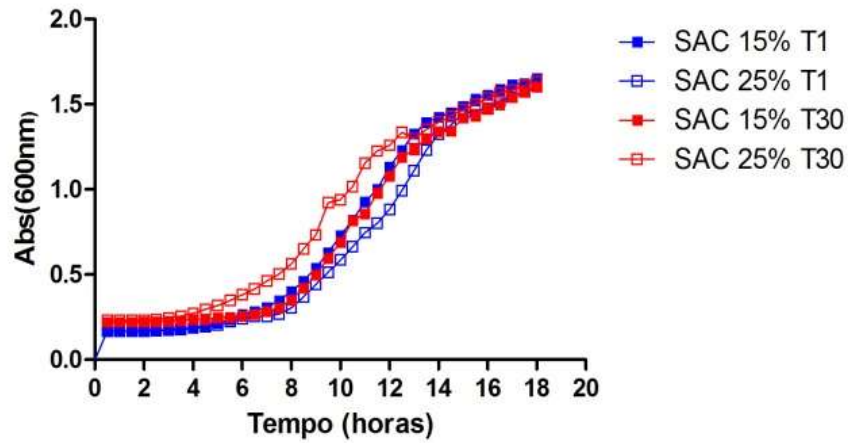
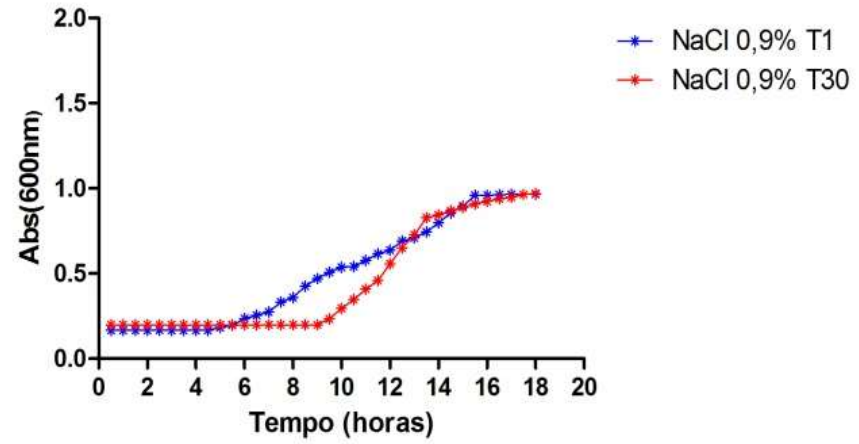
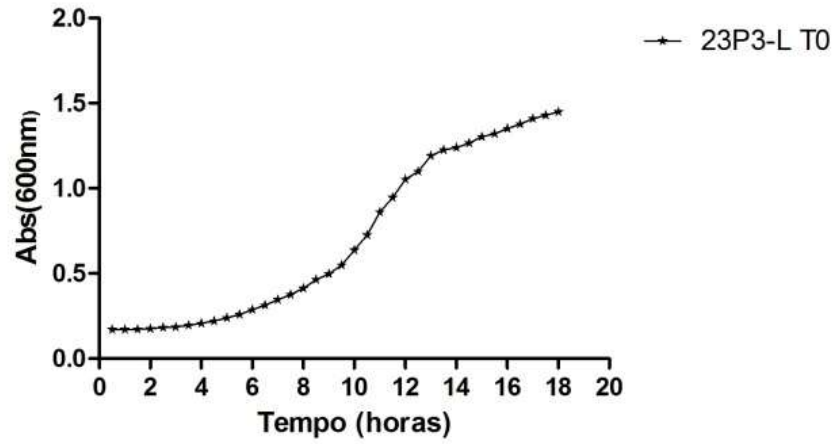


Figura 21. Cinética de reativação de *Lactobacillus satsumensis* 18P-Aem em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,001 e 0,076.

23P3-L

(Continua)



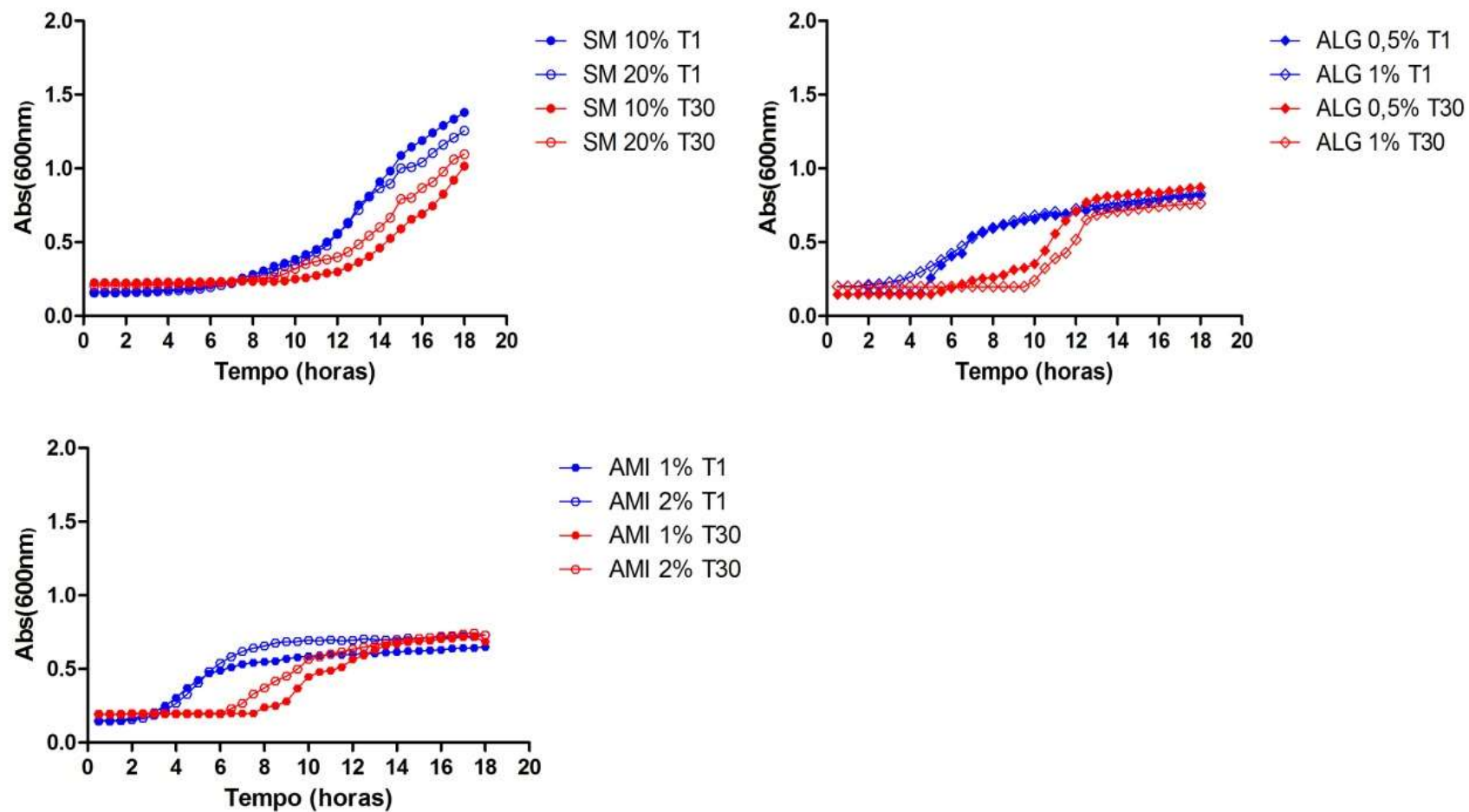


Figura 22. Cinética de reativação de *Lactobacillus satsumensis* 23P3-L em caldo MRS a 37°C. A capacidade de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600nm a cada 30 minutos, durante 18 horas num leitor de ELISA. O resultado é média de três leituras de um experimento realizado. A curva em preto (T0) refere-se à curva de reativação do microrganismo antes da liofilização, as curvas em azul referem-se às amostras recém-liofilizadas (T1) e em vermelho àquelas armazenadas por 30 dias (T30). Símbolos cheios indicam menor concentração do crioprotetor e os vazios, maior concentração. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 0,002 e 0,058.