

Maria Carolina Pais Pinto de Oliveira

Efeito protetor de *Lactobacillus plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1) de queijo Minas artesanal na infecção experimental por *Escherichia coli* EHEC e EIEC e o desenvolvimento de leite de búfala fermentado

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza (DTIPOA/EV/UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

BELO HORIZONTE – MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2016

O48e Oliveira, Maria Carolina Pais Pinto de, 1983-
Efeito protetor de *Lactobacillus plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1) de queijo Minas artesanal na infecção experimental por *Escherichia coli* EHEC e EIEC e o desenvolvimento de leite de búfala fermentado / Maria Carolina Pais Pinto de Oliveira. – 2016.
83p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientador: Jacques Robert Nicoli

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite de búfala – Análise – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 3. Leite fermentado – Análise – Teses. 4. Probióticos – Teses. 5. Lactobacilo – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de. II. Nicoli, Jacques Robert. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

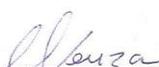
CDD – 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

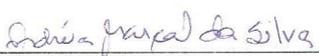
MARIA CAROLINA PAIS PINTO DE OLIVEIRA

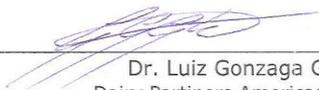
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

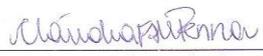
Aprovada em 28 de Março de 2016, pela banca constituída pelos membros:

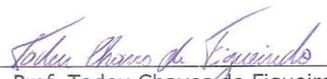

Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente - Orientador


Prof. Jacques Robert Nicoli
Instituto de Ciências Biológicas - ICB


Profª. Andréia Marçal da Silva
Universidade Federal de São João Del-Rei - UFSJ


Dr. Luiz Gonzaga Guedes Neto
Dairy Partiners Americas Brasil -NESTLÉ


Profª. Claudia Freire de Andrade Morais Penna
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



“ O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho” (Abraham Lincoln)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado o meu caminho e me inspirado a ter esperança e confiança.
Aos meus amores, meus queridos pais, Ademir e Marisa, pelo constante incentivo, força e paciência. Minha eterna gratidão.
Ao Professor Dr. Marcelo Resende de Souza, pela orientação e dedicação durante o doutorado, dividindo seus conhecimentos e pela grande ajuda.
Ao Professor Dr. Jacques Robert Nicoli, pela essencial colaboração em todas as etapas desse trabalho e pela paciência em transmitir sua sabedoria.
À Professora Dra. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, pela atenção, colaboração e amizade.
Aos Professores Dra. Andréia Marçal da Silva, Tadeu Chaves de Figueiredo e ao Dr. Luiz Gonzaga Guedes Neto, pela disponibilidade e colaboração.
Aos professores do DTIPOA, principalmente aos Professores Leorges, Mônica Leite e Mônica Pinho, por todos os ensinamentos, que sempre serão de grande valia.
Aos funcionários do DTIPOA, em especial à Maura, pela amizade e paciência em contribuir com os ensinamentos na parte prática, assim como pela grande ajuda e apoio do Marco Antônio.
Ao Danilo, pela atenção, disponibilidade e orientação nas análises estatísticas.
Ao Leonardo Acúrcio, pelo grande auxílio e paciência durante os experimentos.
Ao IC Gustavo Valente, que trabalhou com seriedade e dedicação durante toda a realização dos experimentos.
Aos colegas do laboratório, Naiara, Givanildo, Renata, Cosme, Felipe, Gabriela, Letícia pela grande contribuição e ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Assim como aos outros colegas do laboratório de Microbiologia do ICB pelo apoio e convivência.
À Professora Dra. Rosa Maria Esteves Arantes e toda sua equipe, pelo grande auxílio na parte histopatológica.
Aos funcionários do LabUFMG, pelo apoio e auxílio no meu experimento.
À todos os meus amigos, que sempre torceram por mim e me apoiaram nessa conquista.
A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.
À Escola de Veterinária, a CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra	14
3.2. Bactérias Ácido Láticas.....	16
3.3. Probióticos.....	17
3.3.1. História e Definição	17
3.3.2. Benefícios associados ao uso de probióticos	18
3.3.3. Mecanismos de ação	20
3.3.3.1. Competição por nutrientes	20
3.3.3.2. Competição por sítios de ligação	20
3.3.3.3. Imunomodulação	21
3.3.3.4. Produção de substâncias antibacterianas.....	22
3.3.3.5. Indução da produção de muco e defensinas.....	23
3.3.4. Gênero <i>Lactobacillus</i>	23
3.3.4.1. Grupo <i>Lactobacillus</i> spp.....	23
3.3.4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	24
3.3.4.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25
3.4. Gênero <i>Escherichia coli</i>	26
3.4.1. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica O157:H7	27
3.4.2. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	27
3.5. Leites fermentados.....	28
3.5.1. Leite fermentado de búfala.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Culturas de bactérias ácido láticas	33
4.2. Micro-organismos patogênicos reveladores da atividade antagonista	33
4.3. Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> EHEC e EIEC.....	33
4.4. Animais para o teste <i>in vivo</i>	34
4.5. Teste de antagonismo <i>in vivo</i> contra <i>E. coli</i> EHEC e EIEC.....	34
4.5.1. Desafio dos camundongos com os patógenos	34
4.5.2. Tratamento dos camundongos	34
4.5.3. Determinação da translocação de <i>E. coli</i> EHEC e EIEC em camundongos Balb/c.....	35
4.6. Preparo e análises dos leites fermentados	36
4.6.1. Análise do leite de búfala <i>in natura</i>	36
4.6.2. Teste de inibidores de crescimento microbiano	36
4.6.3. Curvas de fermentação / crescimento	36

4.6.4. Preparo	37
4.6.5. Análises físico-químicas dos leites fermentados.....	37
4.6.6. Avaliação microbiológica dos leites fermentados	37
4.6.6.1. Enumeração de lactobacilos	37
4.6.6.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	38
4.6.6.3. Pesquisa de bolores e leveduras.....	38
4.6.6.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	38
4.6.6.5. Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp.....	38
4.6.7. Análise Sensorial.....	38
4.7. Delineamento Experimental	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> EHEC e EIEC.....	40
5.2. Teste de proteção <i>in vivo</i> contra <i>E. coli</i> EHEC e EIEC	41
5.2.1. Translocação em camundongos Balb/c.....	41
5.2.2. Análises histopatológicas.....	41
5.2.2.1. Exames histológicos dos rins, fígados e cólons.....	41
5.2.2.2. Exames histológicos dos íleos dos grupos inoculados com EHEC	43
5.2.2.3. Exames histológicos dos íleos dos grupos inoculados com EIEC.....	45
5.3. Avaliação do leite de búfala <i>in natura</i>	47
5.3.1. Teste de inibidores de crescimento microbiano	48
5.3.2. Curvas de Fermentação / Crescimento.....	48
5.3.2.1. pH.....	48
5.3.2.2. Enumeração das bactérias- ácido-láticas	49
5.4. Avaliação físico-química dos leites fermentados durante o armazenamento ..	50
5.4.1. pH.....	50
5.4.2. Teor de proteína	51
5.4.3. Teor de gordura	52
5.5. Avaliação microbiológica dos leites fermentados	53
5.5.1. Enumeração de bactérias ácido-láticas.....	53
5.5.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	54
5.5.3. Pesquisa de bolores e leveduras.....	54
5.5.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	54
5.5.5. Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp.....	55
5.6. Análise Sensorial.....	55
5.6.1. Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos e intenção de compra	55
6. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	77
ANEXO I: Resultados (médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos de três repetições) dos testes de antagonismo <i>in vitro</i> de bactérias ácido-láticas contra microrganismos indicadores	77
ANEXO II: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de 12 amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal.....	78

ANEXO III: Percentual de inibição de 12 amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, em pH gástrico e sais biliares, nos tempos 6 e 12 horas de crescimento.....	79
ANEXO IV: Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética No Uso De Animais – CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais	80
ANEXO V: Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética Em Pesquisa – COEP, da Universidade Federal de Minas Gerais	81
ANEXO VI: Médias de pH e contagens de bactérias ácido-láticas (log UFC/mL), de três repetições de leite de búfala fermentados com <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1, nos tempos de fermentação de 0 a 26 horas	82
ANEXO VII: Médias de pH e contagens de bactérias ácido láticas (Log ₁₀ UFC/mL), de três repetições de leites de búfala fermentados por <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1, armazenados a 4-7 °C, durante os dias 1, 14 e 28 de estocagem.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Requisitos físico – químicos oficiais para inspeção de leites fermentados ...	29
Quadro 2. Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados.....	29
Quadro 3. Dados comparativos entre o leite de bubalinos e bovinos, quanto à composição de seus constituintes, a partir de dois trabalhos publicados no Brasil.....	30
Quadro 4. Valores médios dos constituintes do leite de búfalas no Brasil e em outros países	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de estudo com seis camundongos Balb/C em cada e esquema de tratamento com <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 e desafio com <i>E. coli</i> EHEC ou <i>E. coli</i> EIEC.....	35
Tabela 2. Parâmetros do leite de búfala resfriado na coleta de três ordenhas.....	47
Tabela 3. Médias dos teores de proteína, de três repetições de leites de búfala fermentados por <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1, durante os dias 1, 14 e 28 de estocagem sob refrigeração a 4-7°C	52
Tabela 4. Médias dos teores de gordura, de três repetições de leites de búfala fermentados por <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1, durante os dias 1, 14 e 28 de estocagem sob refrigeração a 4-7°C	52
Tabela 5. Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites de búfala esterilizados, fermentados por <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 armazenados por 14 e 28 dias, sob refrigeração 4-7°C.....	55
Tabela 6. Análise da intenção de compra dos leites fermentados de búfala com <i>L. plantarum</i> B7 ou <i>L. rhamnosus</i> D1, nos dias 14 e 28 de armazenamento sob refrigeração a 4-7°C	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das 5 microrregiões produtoras do queijo Minas artesanal.....	15
Figura 2. Mapa do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.....	15
Figura 3. Médias dos halos de inibição (mm) e desvio padrão dos testes de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 contra <i>E. coli</i> EHEC e <i>E. coli</i> EIEC...	40
Figura 4. Aspectos histológicos dos rins e dos fígados dos grupos inoculados com EHEC e EIEC sem lesões dignas de nota (10X). (A) rim do grupo EHEC, (B) rim do grupo EIEC, (C) fígado do grupo EHEC, (D) fígado do grupo EIEC, (E) cólon do grupo EHEC, (F) cólon do grupo EIEC. Coloração com Hematoxilina-Eosina.....	42
Figura 5. Aspectos histológicos dos íleos dos grupos infectados com EHEC (A) e (B) grupo EHEC (4X) e (10 X), respectivamente, (C) grupo desafiado <i>L. plantarum</i> x EHEC (4X), (D) grupo desafiado <i>L. rhamnosus</i> x EHEC (4X). Setas contínuas: lesões com perda focal da arquitetura das vilosidades intestinais. Setas tracejadas: necrose focal da submucosa e mucosa. Coloração com Hematoxilina-Eosina.	44
Figura 6. Aspectos histológicos dos íleos dos grupos infectados com EIEC (A) e (B) (4X) e (10 X), respectivamente, (C) grupo desafiado <i>L. plantarum</i> x EIEC (4X), (D) grupo desafiado <i>L. rhamnosus</i> x EIEC (4X). Setas contínuas: lesões com perda focal da arquitetura das vilosidades intestinais. Setas tracejadas: necrose focal da submucosa e mucosa. Coloração com Hematoxilina-Eosina.....	46
Figura 7. Médias de pH durante a fermentação de leites de búfala em 3 repetições, nos tempos de fermentação (0-26 horas), por <i>L. plantarum</i> (B7) e <i>L. rhamnosus</i> (D1).....	49
Figura 8. Médias de lactobacilos em três repetições das contagens (log UFC/mL) durante a fermentação de leite de búfala esterilizado, nos tempos de fermentação (0-26 horas), por <i>L. plantarum</i> (B7) e <i>L. rhamnosus</i> (D1)	50
Figura 9. Médias de pH durante a fermentação do leite de búfala, em três repetições, nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento, armazenados a 4-7 °C e fermentados por <i>L. plantarum</i> (B7) e <i>L. rhamnosus</i> (D1)	51
Figura 10. Médias das contagens de bactérias ácido lácticas (Log10 UFC/mL) em ágar MRS no leite de búfala fermentado, em três repetições, nos dias 1, 13 e 27 de armazenamento, por <i>L. plantarum</i> (B7) e <i>L. rhamnosus</i> (D1) e armazenados a 4-7 °C.	53

RESUMO

Bactérias ácido-láticas probióticas quando ingeridas em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do consumidor. São inúmeros os estudos sobre as atividades exercidas por esses micro-organismos probióticos no intestino e também em outras partes do organismo, como a inibição de várias bactérias patogênicas; modulação do sistema imune; auxílio na constipação; redução do colesterol sanguíneo; atividades anticarcinogênicas; entre outras. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, contra *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e elaborar um leite fermentado funcional a partir de leite de búfala. Nos testes *in vitro*, as bactérias lácticas testadas foram capazes de produzir halo de inibição frente aos micro-organismos patogênicos. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a capacidade de inibição por parte das amostras de *Lactobacillus*, apenas a susceptibilidade de cada patógeno. Nos testes *in vivo*, os animais do grupo tratado com *L. rhamnosus* D1 e que foram inoculados com EIEC apresentaram o melhor resultado de proteção, com o íleo preservado na maioria dos animais. Os leites fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 apresentaram acidificação igual ($p > 0,05$), além da manutenção de contagens de lactobacilos adequadas (acima de 10^7 UFC/mL) ao longo de 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4-7°C). Os resultados da análise sensorial dos leites fermentados armazenados por 14 e 28 dias sob refrigeração a 4-7°C indicaram uma igualdade de preferência pelos leites fermentados, que apresentaram uma mediana (4) correspondente ao grau de aceitação “gostei”. Na análise por intenção de compra, o leite fermentado por *L. rhamnosus* D1 teve média 63,28% e o leite fermentado por *L. plantarum* B7 teve média de 61,31% nos dois dias de armazenamento. Portanto, os leites de búfala fermentados com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 possuem boa aceitação por parte dos avaliadores, além de veicularem potencial probiótico, destacando-se o *L. rhamnosus* D1.

Palavras-Chave: *Lactobacillus*, queijo Minas artesanal, probióticos, leite fermentado, *Escherichia coli*, EHEC, EIEC

ABSTRACT

Lactic acid bacteria when ingested in adequate amounts confer benefits to consumer health. There are numerous studies on the activities performed by these probiotic micro-organisms in the gut and also in other parts of the body, such as the inhibition of various pathogenic bacteria; immune system modulation; aid in constipation; blood cholesterol reduction; anticarcinogenic activities, among others. The aim of this study was to evaluate the probiotic potential in vitro and in vivo of Lactobacillus plantarum B7 e Lactobacillus rhamnosus D1 isolated from Minas artisanal cheese Serra of the Canastra against enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O157:H7 and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC), in order to develop a functional fermented milk inhibition using buffalo milk. In in vitro tests all tested lactic acid bacteria were able to produce inhibition zone against the pathogenic micro-organisms. No significant difference was observed ($p > 0.05$) in the inhibition ability by the samples of Lactobacillus, only in the susceptibility of each indicator. In in vivo tests, animals treated with Lactobacillus rhamnosus D1, which were challenged with EIEC were those with the best result of protection, with the ileum preserved in most animals. The milk fermented by L. plantarum B7 and L. rhamnosus D1 showed acidification ability statistically equal, and maintenance of appropriate lactobacilli counts (above 10^7 CFU/mL) during 28 days of storage under refrigeration (4-7°C). The results of the sensory analysis of the fermented milks stored for 14 and 28 days under refrigeration at 4-7°C indicated similar preference for both milk fermented, with a median (4) corresponding to the degree of acceptance "liked ". In analysis by purchase intent, the fermented milk L. rhamnosus D1 had 63.28% and L. plantarum B7 had 61.31% in the two days of storage. Concluding, buffalo milk fermented with L. plantarum B7 and L. rhamnosus D1 have good acceptance, besides they have adequate probiotic potential, highlighting mainly L. rhamnosus D1.

Keywords: Lactobacillus, Minas artisanal cheese, probiotics, fermented milk, Escherichia coli, EHEC, EIEC

1. INTRODUÇÃO

O adequado funcionamento do organismo humano depende do equilíbrio constante entre os micro-organismos habitantes de seus epitélios e mucosas. O desenvolvimento de pesquisas e tecnologias voltadas para a área dos alimentos funcionais tem o intuito de fornecer aos seres humanos melhorias na saúde e uma maior qualidade de vida. Dentre esses produtos funcionais encontram-se bactérias ácido-láticas probióticas, que são incorporadas em alimentos, como leites fermentados.

Probióticos são micro-organismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do consumidor (FAO/OMS, 2002). São inúmeros os estudos sobre as atividades exercidas por esses micro-organismos no intestino e também em outras partes do organismo, como no caso dessa pesquisa na inibição de bactérias patogênicas e prevenção de doenças.

Os benefícios à saúde oriundos do uso de probióticos incluem a resistência à patógenos intestinais; o auxílio na digestão da lactose; a modulação do sistema imunológico; efeito anticâncer de cólon; diminuição na desintoxicação/excreção de metabólitos tóxicos microbianos; prevenção da alergia; diminuição do colesterol; efeito anti-hipertensivo; prevenção às infecções urogenitais; prevenção de infecções causadas por *Helicobacter pylori*; valor nutricional reforçado; prevenção e tratamento de encefalopatia hepática e ação positiva no sistema nervoso, como nos casos de ansiedade, depressão e stress (Nagpal *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015).

As bactérias ácido-láticas probióticas se dividem em vários gêneros e além de contribuir em benefícios à saúde, também auxiliam na realização de alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação do queijo e favorecerem a conservação e segurança higiênico-sanitária dos alimentos. O grupo dos *Lactobacillus* compreende esses micro-organismos desejáveis.

Os lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, como *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 podem ser empregados na criação de um outro produto com apelo probiótico e ao serem veiculados por meio de leites fermentados podem ser uma possível solução para a prevenção de infecções de origem alimentar por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

Os micro-organismos patogênicos que foram utilizados nesse estudo, EHEC e EIEC, geralmente podem ser veiculados por meio de alimentos contaminados, crus ou mal cozidos, como carne, leite e outros produtos frescos. EHEC é uma bactéria patogênica causadora de colite hemorrágica, podendo levar ao desenvolvimento de uma Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU). A SHU é uma complicação grave que cursa com anemia e queda das plaquetas por destruição maciça das mesmas, causa danos aos rins e dependendo do hospedeiro pode ser fatal. EIEC causa uma doença semelhante à disenteria, com diarreia profusa com sangue, dor abdominal intensa e febre alta, que ocorre principalmente em crianças e em países em desenvolvimento.

Para o desenvolvimento e a elaboração de um leite fermentado, contendo um micro-organismo que agregue propriedades probióticas contra a EHEC e EIEC e que possua uma boa aceitação sensorial, foi utilizado leite de búfala. O leite de búfala possui melhor qualidade nutricional e tecnológica, se comparado ao leite de vaca, com altos teores de proteína, gordura e minerais e menor teor de colesterol, o que justifica seu uso em leites fermentados.

Atualmente são poucos os trabalhos referentes ao leite de búfala fermentado, não existindo na literatura atual, artigos com a inoculação de bactérias probióticas isoladas de queijo Minas artesanal. Por isso, são necessárias pesquisas para aumentar-se a utilização de uma fonte rica de nutrientes, como o leite de búfala, para a obtenção de potencial crescimento de lactobacilos e sua eficaz atuação contra bactérias patogênicas, agregando maior valor a esse produto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus* isolados de queijo Minas artesanal contra micro-organismos patogênicos e elaborar um leite fermentado funcional a partir de leite de búfala.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a capacidade antagonismo *in vitro* de linhagens de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra contra *E. coli* enterohemorrágica 0157:H7 (EHEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).
- 2) Avaliar *in vivo* o potencial protetor das duas amostras de *Lactobacillus* testadas no objetivo anterior atuando na infecção exercida por EHEC e EIEC em camundongos BALB/c.
- 3) Elaborar leites fermentados com o leite de búfala inoculado com *Lactobacillus*, avaliando os resultados de análises sensoriais e parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo de 28 dias de armazenamento sob refrigeração.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra

O estado de Minas Gerais responde por mais da metade da produção de queijo do Brasil. Esses laticínios são compostos, em sua maior parte, por estabelecimentos de pequeno porte, em torno de 500, distribuídos em todo o território mineiro. As microrregiões demarcadas (Serro, Canastra, Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre) possuem 9.789 produtores familiares ocupando uma área de 63.690 km², com uma produção anual estimada em 29.897 toneladas, gerando 26.792 empregos diretos, conforme Figura 1 (EMATER, 2015). As regiões produtoras possuem microclimas, fatores físico-naturais e aspectos socioculturais que propiciam o desenvolvimento de bactérias específicas, em pastagens típicas, que se multiplicam e transferem a cada queijo sabor e aspecto típico (Meneses, 2006; Almeida e Soares, 2008).

A microrregião da Serra da Canastra, identificada pela Portaria N^o 694 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (Minas Gerais, 2004) como produtora do Queijo Minas artesanal, compreende os municípios de Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita, como mostrado na Figura 2. Nessa região, de acordo com dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER, 2015), foram produzidas mais de 5.787 toneladas de queijo, por mais de 1.529 produtores rurais, em uma área de 7.452 Km².

Os queijos na Serra da Canastra são produzidos com leite de vaca cru integral, cultura láctea natural (pingo), coalho e sal; possuem consistência semi-dura com tendência a macia; formato cilíndrico; altura entre 4 a 6 cm; diâmetro de 15 a 17 cm e peso entre 1,0 a 1,2 kg. Em São Roque de Minas, Medeiros e Vargem Bonita, os queijos possuem características diferenciadas, com formato cilíndrico, altura entre 7 a 8 cm, diâmetro de 26 a 30 cm, peso entre 5 a 7 kg, com a denominação de queijo Canastra Real ou Canastrão. Este tipo de queijo também era produzido em ocasiões especiais, como visitas do Bispo Católico ou de autoridades do império ou da capitania (EMATER, 2004).

As queijarias artesanais são estabelecimentos situados em propriedade rural, destinadas exclusivamente à produção do queijo Minas artesanal. Só podem funcionar para a manipulação de leite da própria fazenda, a partir do leite cru obtido de um rebanho sadio e, que no momento de sua utilização artesanal, atenda a padrões microbiológicos e físico-químicos específicos (Minas Gerais, 2002).

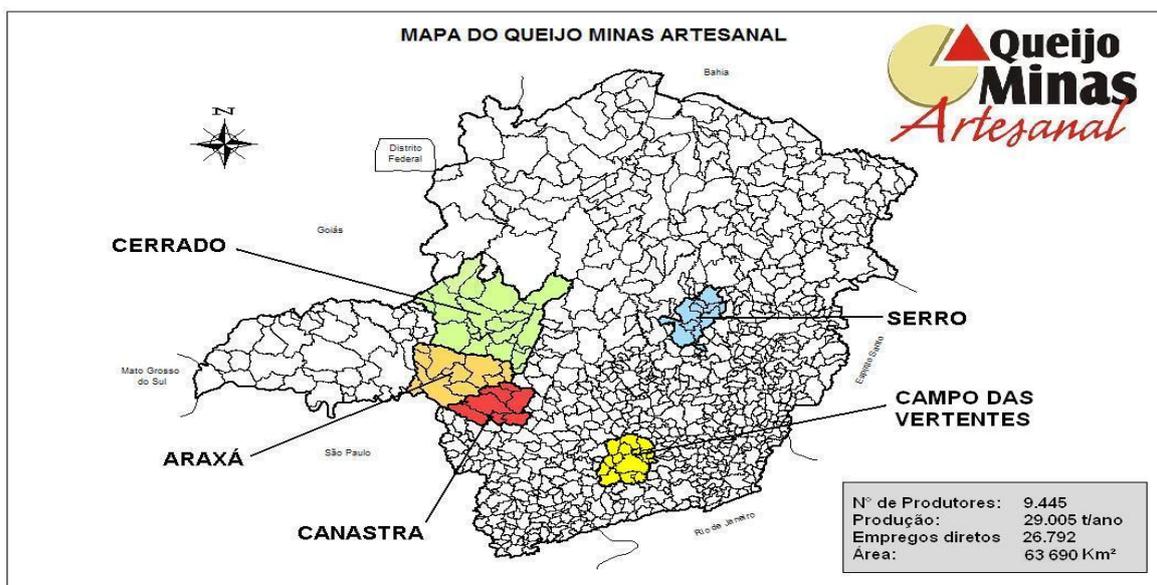


Figura 1. Mapa das 5 microrregiões produtoras do queijo Minas artesanal (EMATER, 2015)



Figura 2. Mapa do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (EMATER, 2015)

A origem das produções características do queijo artesanal de Minas Gerais foram as técnicas típicas da serra da Estrela, em Portugal, onde o queijo é feito artesanalmente a partir de leite cru de ovelhas, principalmente com mão-de obra feminina, possuindo características específicas de baixas temperaturas da região, pastagens de montanha e utilizando o extrato de flor e brotos do cardo como coagulante do leite. O cardo é considerado uma praga das pastagens e possui folhas acinzentadas com espinhos, flores rosadas ou amarelas, caule ereto com revestimento piloso. A prensagem manual do queijo produz uma massa coagulada consistente e a maturação confere sabor específico ao alimento. Ao longo da história, os fabricantes de queijo Minas foram criando os próprios modos de fabricação do queijo. Sua confecção possui variações por todo território de Minas Gerais devido às características específicas reconhecidas para regiões geográficas distintas do estado (Meneses, 2006).

No início da sua elaboração, o queijo produzido em Minas utilizava o leite de vacas coagulado com coagulante feito à base de parte do estômago, o retículo, seco e salgado, de bezerro ou cabrito. O uso de segmentos do estômago de tatus foi utilizado na região da Serra da Canastra para obter o mesmo efeito. O coalho atualmente é industrializado e possui a pepsina e a renina que proporcionam a coagulação do leite. Essa tradição de fabricação do queijo, nas regiões do Serro, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Araxá, Sul de Minas e em outras regiões, utiliza a matéria prima local em várias etapas da produção e estabelece um queijo reconhecido mundialmente como “artesanal tipo Minas” (Meneses, 2006).

O queijo Minas artesanal deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, utilizando-se coalho, fermento natural, sal, e no ato da prensagem apenas o processo manual, sendo retirado e beneficiado na propriedade de origem (Minas Gerais, 2008).

O “pingo” é o fermento que leva as características específicas ao queijo, sendo composto por bactérias ácido lácticas fermentativas específicas de cada região. Ele é drenado junto ao soro, durante o primeiro dia de maturação dos queijos recém produzidos e reflete o padrão de cada região típica e suas especificidades como um acervo bacteriano (Meneses, 2006; Bruno e Carvalho, 2009).

Estes queijos, por serem alimentos produzidos artesanalmente a partir do leite fermentado apresentam uma microbiota bastante diversificada. Esse queijo é particularmente rico em bactérias ácido lácticas (BAL) provenientes de diferentes origens como leite, soro fermento, silagem e água, podendo ser reconhecidas como probióticas (Guedes Neto, 2004; Resende, 2011).

3.2. Bactérias Ácido Lácticas

O grupo das BAL, de acordo com Jay (2005) compreende 13 gêneros de bactérias Gram positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Segundo Resende (2011), foram identificadas ao nível molecular elevadas populações de BAL nos queijos da região da Serra da Canastra. As espécies de BAL mais frequentemente isoladas nestes queijos foram *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, sendo que *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus paraplanarum* ainda não constavam na literatura científica àquela época.

As BAL são anaeróbias facultativas, ou microaerofílicas, não esporuladas e ácido tolerantes. São bactérias estritamente fermentativas e possuem necessidades nutricionais complexas, geralmente utilizando a lactose como fonte de carbono. Essas bactérias se dividem em dois grupos

com base nos produtos finais do metabolismo da glicose: ácido láctico como produto principal, ou único, da fermentação da glicose, sendo designadas bactérias homofermentativas; e bactérias que produzem quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono, etanol a partir de hexoses, que são denominadas heterofermentativas. Os produtos do metabolismo, como por exemplo, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas tornam esses micro-organismos capazes de exercerem efeitos benéficos ao hospedeiro. Devido à produção dessas substâncias antimicrobianas são denominados micro-organismos probióticos, apresentando resultados benéficos contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes (Salminen e Von Wright, 1993; Gomes e Malcata, 1999, Jay, 2005; Dworkin, 2006).

São consideradas catalase negativa, mas algumas exceções ocorrem em algumas espécies que formam catalase ou citocromos em meio contendo hematina ou compostos relacionados. A produção de pseudocatalase (catalase não-heme) por alguns lactobacilos pode levar a confusões no processo de identificação de bactérias lácticas (Holzapfel et al., 2001).

As BAL probióticas são consideradas micro-organismos benéficos e contribuem para a realização das alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação do queijo: são responsáveis pela transformação da lactose em ácido láctico, e suas enzimas contribuem na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades sensoriais do produto final. As BAL podem ser adicionadas no início da fabricação de queijo, ou podem ser utilizadas aquelas que já ocorrem naturalmente no leite, como ocorre no caso dos queijos artesanais (Beresford et al., 2001). Assim, essas bactérias desejáveis contribuem para a formação das características intrínsecas, além de favorecer também a conservação e a segurança higiênico-sanitária dos queijos.

3.3. Probióticos

3.3.1. História e definição

A origem dos produtos lácteos fermentados é mencionada na Bíblia e nos livros sagrados do hinduísmo. As condições climáticas favoreceram o desenvolvimento de vários leites fermentados tradicionais ou produtos lácteos fermentados, como kefir, koumiss, leben e dahi (Hosono, 1992). Muitos destes produtos são ainda amplamente consumidos, tendo sido muitas vezes utilizados terapêuticamente antes do reconhecimento da existência de bactérias (Shortt, 1999).

O pesquisador Elli Metchnikoff foi considerado o precursor do conceito probióticos. Em seu livro de 1907, “O prolongamento da vida”, ele propôs que colônias de bactérias desempenhavam um papel adverso no envelhecimento e na saúde de adultos (a morte inicia no cólon). Essa teoria surgiu da observação de que os camponeses búlgaros, que consumiam alimentos com leites fermentados tinham uma notável longevidade, com média de vida de 87 anos e sendo que de cada quatro em mil viviam acima de cem anos. Ele postulou que o corpo era lentamente envenenado (auto-intoxicado) por toxinas produzidas por micro-organismos proteolíticos no intestino, que eram responsáveis pelo envelhecimento. Ele ainda sugeriu a hipótese de que o envelhecimento poderia ser evitado, modificando a microbiota intestinal com a utilização de “micróbios úteis” obtidos pelo consumo de leite fermentado e de bactérias produtoras de ácido-láctico. Os experimentos de Metchnikoff o levaram a acreditar que essa cepa de bactéria (o qual ele chamou de “Bulgarian bacillus”), poderia estabelecer-se com sucesso no

intestino e diminuir o número de bactérias “putrefativas”, retardando assim o processo de envelhecimento (Mizock, 2015).

A descoberta de bifidobactérias por Tissier, em crianças amamentadas, também desempenhou um papel fundamental no estabelecimento do conceito de que uma bactéria específica participaria na manutenção da saúde. Em 1906, Henry Tissier relatou benefícios clínicos na modulação da microbiota em crianças com infecções intestinais. Em 1917, durante a I Guerra Mundial, Alfred Nissle isolou uma amostra de *Escherichia coli* não patogênica a partir de fezes de um soldado, o qual foi um dos poucos que não desenvolveu enterocolite durante um surto grave de shigelose. Essa amostra foi nomeada de *E. coli* Nissle 1917 e foi utilizada subsequentemente para os tratamentos gastrintestinais de salmonelose e shigelose. No Japão, no início de 1930, Shirota centrou a sua investigação sobre a seleção de linhagens de bactérias intestinais que poderiam sobreviver à passagem pelo intestino e na utilização destas no desenvolvimento de leites fermentados para distribuição em sua clínica. Seu primeiro produto contendo *L. acidophilus* Shirota (posteriormente nomeado *L. casei* Shirota) foi a base para a criação da empresa Yakult Honsha (Soccol et al., 2010; Mizock, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012) estipula que a quantidade mínima viável para os probióticos atuarem de maneira benéfica para o hospedeiro deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa fornecedora do produto comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação de eficácia deve incluir laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares. A quantidade do probiótico em Unidade Formadora de Colônias (UFC), contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, que deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.

A fabricação de leites fermentados contendo bactérias probióticas tem como base a seleção desses micro-organismos pela estabilidade frente ao ácido e à bile; do gênero ao qual pertence a bactéria preferencialmente ser de origem humana; a capacidade de sobreviver no trato gastrintestinal humano e a capacidade de produzir compostos antimicrobianos no intestino. Também necessitam, de acordo com *Food and Drug Administration* (FDA), serem Geralmente Reconhecidas como Seguras - em tradução livre do termo *Generally Recognized as Safe* (GRAS), ou seja, não serem patogênicas e não causarem doenças tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da transmissão da resistência aos antimicrobianos. As espécies mais utilizadas na fermentação, do gênero *Bifidobacterium* são: *B. breve*, *B. bifidum*, *B. lactis* e *B. longum* – e com *Lactobacillus* são: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* (Collins et al., 1998; Lee et al., 1999; Saarela et al., 2000; Nagpal et al., 2012).

Os leites fermentados com aditivos bacterianos probióticos viáveis vem demonstrando em diversas pesquisas muitos benefícios para os consumidores. Entre esses benefícios pode-se citar a redução dos níveis de colesterol, redução da lactose pelo aumento da sua digestão, controle de infecções por agentes patogênicos entéricos, prevenção de diarreias e efeitos anticarcinogênicos (Gilliland et al., 1985; Gomes e Malcata, 1999; Saad, 2006).

3.3.2. Benefícios associados ao uso de probióticos

Os mecanismos propostos envolvidos na resistência a patógenos intestinais incluem a atividade antagonista, efeito adjuvante de aumento na produção de anticorpos, efeito imune sistêmico, inibição por adesão, competição por nutrientes, resistência na colonização e limite no acesso de bactérias intestinais (pH, bacteriocinas, peptídeos bacterianos, produção de ácido láctico e metabólitos de oxigênio tóxicos). No caso das gastroenterites por Rotavírus ocorre o aumento da resposta de IgA contra o vírus (Dave e Shah, 1997; Nagpal et al., 2012).

Os probióticos estão associados a propriedades anti-carcinogênicas pela atividade antimutagênica, desintoxicação de metabólitos carcinogênicos, alteração na atividade enzimática pró-cancerosa de micro-organismos do cólon, estimulação da função imune e influência na concentração de sais biliares (Kumar et al., 2011a, b). Goldin e Gorbach (1980) relataram que a introdução de *L. acidophilus* na dieta reduziu a incidência de tumores do cólon induzidos quimicamente em ratos. Os probióticos possuem a capacidade de diminuir os níveis de β -glicuronidase, nitroredutase, azoredutase, e β -glicosidase, a capacidade de nitroação, assim como a diminuição na absorção de agentes mutagênicos nocivos, que podem contribuir para a carcinogênese do cólon (Reddy, 1999).

Os lactobacilos utilizados em produtos lácteos podem aumentar a resposta imune do hospedeiro pelo efeito adjuvante de aumento na produção de anticorpos, efeito imune sistêmico, ativação de antígenos específicos e não-específicos contra infecções e tumores e efeito adjuvante em resposta imune antígeno-específica. Pode ocorrer a proliferação de linfócitos, produção de interleucinas 1, 2, e 6, do fator de necrose tumoral (TNF), a produção de prostaglandina E, proteína total no soro, albumina, globulina e o interferon gama (Philip e Epstein, 1986; Raitano e Kore, 1993; Aatourri et al., 2002). As culturas probióticas independentemente dos mecanismos envolvidos podem estimular tanto a imunidade específica quanto a não-específica, com potenciais aplicações terapêuticas e profiláticas no tratamento de infecções e carcinogêneses.

A redução do colesterol pela ingestão de produtos lácteos fermentados foi relatada por vários trabalhos (Mann e Spoerry, 1974; Gopal et al., 1996; St-Onge et al., 2000; Pereira e Gibson, 2002). Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos são a assimilação de colesterol por bactérias, desconjugação de sais biliares, ligação do colesterol a paredes de células bacterianas e na redução da biossíntese do colesterol (Pulusoni e Rao, 1983; Pereira e Gibson, 2002).

São inúmeros os efeitos positivos ocasionados por alimentos funcionais contendo probióticos, os quais oferecem lactase para destruir e permitir uma melhor digestão da lactose pré-formada; atuam como papel regulador na doença alérgica, por meio da prevenção da translocação de antígenos para a corrente sanguínea e na prevenção nas respostas imunológicas excessivas com o aumento da quantidade de antígenos de estimulação do intestino, como efeito supressor sobre a proliferação de linfócitos e interleucina-4 (Sütas et al., 1996; Pessi et al., 2000).

Outros benefícios potenciais incluem proteção contra infecções vaginais e urinárias pela aderência às células vaginais e do trato urinário, exclusão competitiva e produção de inibidores (H_2O_2 , biossurfactantes); prevenção de doenças cardíacas pela alteração na atividade da enzima BSH e pelo efeito antioxidante; efeito anti-hipertensivo pela atividade da peptidase bacteriana na proteína do leite, que resultam em tripeptídeos anti-hipertensivos; aumento do valor nutricional pela produção de vitaminas e cofatores; diminuição na desintoxicação de produtos catabólicos eliminados pelo rim e fígado, por meio do aumento da contagem de células de bifidobactérias e mudança de colônias microbianas que possuam preferência por metabolizar proteínas do que carboidratos, sendo menos tóxica, com diminuição de metabólitos putrefativos e melhorias na encefalopatia hepática após a administração de bifidobactérias. Além desses, prevenção de infecções causadas por *Helicobacter pylori* por mecanismos de colonização competitiva, inibição no crescimento e adesão em células da mucosa e diminuição na concentração gástrica de *H. pylori* (Nagpal et al., 2012).

Atualmente muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de correlacionarem a ação de probióticos no tratamento e prevenção de alterações que ocorrem no sistema nervoso, como a ansiedade, depressão e estresse. No estudo de Liu et al. (2015), os mecanismos propostos nesses transtornos psíquicos consistem na alteração da composição da microbiota do intestino ou regulação de múltiplos sinais das seguintes vias: vias mediadas por nervo vago, vias da resposta imune e vias mediadas por metabólitos, porém esses mecanismos ainda não estão bem definidos.

3.3.3. Mecanismos de ação

Um probiótico com boa atuação deve ser não patogênico, não tóxico, resistente ao ácido gástrico e preferencialmente possuir aderência ao tecido epitelial do intestino e produzir substâncias microbianas. O probiótico deve persistir, ainda que por períodos curtos no trato gastrointestinal influenciando atividades metabólicas como a assimilação de colesterol, atividade da lactose e a produção de vitaminas (Suvarna e Boby, 2005).

A sobrevivência de probióticos no intestino depende dos fatores de colonização que eles possuem, que lhes permitem resistir aos mecanismos antibacterianos que operam no intestino. Juntamente com os mecanismos antibacterianos, eles necessitam evitar os efeitos do peristaltismo, que tendem a expulsar as bactérias com os alimentos. Esses podem ser evitados por meio da própria imobilização, ou pela multiplicação no intestino desses micro-organismos benéficos a uma taxa muito mais rápida, do que a taxa de remoção pelo peristaltismo. A linhagem probiótica deve ser resistente ao ácido biliar; por exemplo, *Bifidobacterium* mostraram serem significativamente menos resistentes ao ácido do que *Lactobacillus*, quando expostas ao suco gástrico humano (Thronton, 1996).

3.3.3.1. Competição por nutrientes

A supressão no crescimento de espécies bacterianas no intestino pode ocorrer devido à competição por nutrientes no lúmen intestinal e à carência nutricional, chegando a reduzir drasticamente algumas espécies da microbiota intestinal (Wilson e Perini, 1988). Essa carência de nutrientes disponíveis possui efeitos benéficos na limitação da manutenção das bactérias patogênicas pela deficiência nutricional (Silva e Alves Filho, 2000).

Além de protegerem o epitélio intestinal, os probióticos evitam que os patógenos utilizem os carboidratos, aminoácidos e minerais para o metabolismo e produzam toxinas, contribuindo assim para a eficiência alimentar e o desempenho do organismo (Guillot, 2000).

No intestino do hospedeiro existe uma relação simbiótica entre as bactérias intestinais, com o fornecimento de quantidades de nutrientes requeridos ativamente por estas, impedindo uma produção excessiva de nutrientes, o qual favoreceria o desenvolvimento de potenciais competidores microbianos patogênicos ao hospedeiro, juntamente com a produção de substratos benéficos ao organismo (Kopp-Hoolihan, 2001; Guarner e Malagelada, 2003).

3.3.3.2 Competição por sítios de ligação

A ingestão de bactérias benéficas como espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* pode impedir a colonização de micro-organismos patogênicos, com a regulação do equilíbrio da microbiota intestinal. De acordo com Utiyama (2004), esse mecanismo se aplica às bactérias ácido lácticas, as quais competem por nutrientes e por locais de ligação no epitélio intestinal e produzem substâncias capazes de reduzir as bactérias patogênicas, sendo denominado exclusão competitiva.

As pesquisas realizadas para verificar a eficácia da competição por sítios de ligação no controle de bactérias patogênicas, principalmente *Salmonella* spp., foram iniciadas há cerca de quarenta anos, no trabalho pioneiro de Nurmi e Rantala (1973). As bactérias intestinais podem reduzir a área de interação das bactérias patogênicas nos cecos com o bloqueio dos sítios de ligação, ou receptores, na mucosa entérica. Andreatti Filho e Sampaio (1999) concluíram que *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. ocupam fisicamente os sítios intestinais, tais como a microbiota normal, colonizando e formando barreira física frente aos patógenos, sendo necessárias para recobrir a superfície de uma célula intestinal cerca de 40 bactérias. A ocupação física dos sítios intestinais pela microbiota normal, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. poderia ser um dos fatores mais importantes que outros fatores propostos para a exclusão competitiva (Bailey, 1993; Jin et al., 1996). Nos trabalhos de Conway et al. (1987) e Stavric (1987), os pesquisadores confirmaram que essa colonização intestinal e ocupação dos sítios intestinais seriam um mecanismo primário à exclusão competitiva (Jin et al., 1997; Fuller e Gibson, 1997).

3.3.3.3. Imunomodulação

As bactérias presentes na microbiota intestinal possuem uma carga antigênica que induzem ao estímulo imunológico do hospedeiro (Perdigon et al., 1993; Tannock, 1998). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são exemplos dessas bactérias que estão diretamente relacionadas com o estímulo da resposta imune por ativação de macrófagos, aumento da produção de anticorpos, proliferação de células T, produção de interferon, outras citocinas, entre outros (Yasui e Ohwaki, 1991; Lee et al., 1993; Sekine et al., 1994; Fuller e Gibson, 1997; Menten, 2001; Delcenserie et al., 2008).

Os probióticos podem estimular as respostas imunes não-específica e específica, o que pode ser constatado em grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos. Esses efeitos são mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - "natural killer") e/ou dos níveis de imunoglobulinas. E esses efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial. Mas, há diferenças na efetividade, de acordo com o tipo de bactéria láctica. O consumo de um ou mais probióticos concomitantemente pode ser realizado para aumentar a resposta imune e atuarem sinergicamente, como no caso da administração de *Lactobacillus* juntamente com *Bifidobacterium* (Kopp-Hoolihan, 2001; Calder e Kew, 2002; Van de Water, 2003).

Tizard (1992) abordou a transferência a partir das células duodenais M dos probióticos viáveis para os linfócitos intra-epiteliais, estimulando os plasmócitos a agirem como antígenos na secreção de IgA. Há uma reação nos linfonodos mesentéricos devido a essa produção de IgA, aumentando o número de células que expressam IgA.

O efeito no estímulo ao sistema imune pode estar vinculado com a capacidade de interação dos micro-organismos probióticos com as placas de Peyer e com as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (Perdigón e Holgado, 2000). De acordo com Cross et al. (2002), os probióticos estimulariam o sistema imune, favorecendo a ação sistêmica por secreção de mediadores pela atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares.

Carlos et al. (2003) observaram que a ingestão de bactérias lácticas pode gerar um aumento na resistência a infecções por patogênicos devido a um acréscimo na produção de anticorpos, resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer, na ativação de macrófagos e linfócitos.

Efeitos imunomoduladores podem ser alcançados mesmo com bactérias probióticas mortas ou apenas com componentes derivados de probióticos, como fragmentos de

peptidoglicanos ou DNA. Produtos probióticos são reconhecidos por células hospedeiras sensíveis a estes, pois possuem receptores de reconhecimento. As principais células-alvo, nesse contexto, são, portanto, as células epiteliais do intestino e as células imunes associadas ao intestino. A interação de probióticos com células epiteliais hospedeiras por adesão pode desencadear uma cascata de sinalização que leva a modulação imunológica. A adesão direta de probióticos em células epiteliais tem sido demonstrada em vários experimentos *in vitro* (Matsuo et al., 1997). Uma exceção é a captação e transcitose de bactérias mediada por células M, que recolhem em um nível baixo antígenos luminiais do intestino para as células dendríticas na lâmina própria. Outro contato direto entre probióticos e células hospedeiras no intestino ocorre por interiorização de bactérias por células dendríticas (DC) que estão localizadas abaixo das células epiteliais (células M) (Macpherson e Uhr, 2004). Estas células são também capazes de recolher antígenos a partir do lúmen do intestino com seus dendritos, por alargá-los pelo epitélio intestinal para o lúmen. Estudos *ex-vivo* demonstraram que DC derivadas de monócitos humanos maturados na presença de *L. rhamnosus* foram capazes de instruir os linfócitos T naïve (que não tiveram contato com antígeno ainda) CD4⁺. Na suplementação oral *in vivo* com *L. rhamnosus*, durante duas semanas em seis pacientes que sofriam de doença de Crohn, houve a indução de uma hiporeatividade, incluindo deficiência nas respostas *ex-vivo* dos subconjuntos de células T helper 1 e 2, demonstrando a importância do papel de DC na modulação imune por probióticos (Braat et al., 2004).

Ácido teicóico, um componente da parede celular do Gram positivo de linhagem probiótica de *L. plantarum* está envolvido na atividade anti-inflamatória deste probiótico. Um mutante com capacidade anti-inflamatória aumentada incorporou muito menos D-Ala em seus ácidos teicóicos do que a linhagem de tipo selvagem e reduziu drasticamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares do sangue periférico e monócitos, devido a em um aumento significativo na produção de IL-10 endógena. Os efeitos observados eram claramente dependentes do receptor TLR-2. Este mutante também foi mais protetor num modelo de colite murina do que o seu homólogo do tipo selvagem (Grangette et al., 2005). Este estudo demonstrou o envolvimento dos TLR-2 no efeito probiótico de *L. plantarum* destacando a importância de TLR para ações probióticas.

Porém, os probióticos também são capazes de proteger a integridade da barreira mucosa do intestino contra a ação destrutiva de *E. coli* na forma independente de TLR. Esta ação é conseguida alterando a sinalização da proteína C quinase resultando numa amplificação da expressão e da redistribuição de proteínas da zônula de oclusão-2 (ZO-2) em células T84 (Zyrek et al., 2007). Isso faz sentido porque ZO-2 é um fator importante para a preservação da função de junção de oclusão no epitélio intestinal. A indução pelo probiótico *E. coli* Nissle 1917 (ECN) da expressão de ZO-2, bem como ZO-1 *in vivo* foi demonstrada no modelo de camundongos. ECN foi ainda capaz de proteger camundongos com colite induzida por sulfato de sódio dextrano, reduzindo a perda de peso corporal e o encurtamento do cólon como consequência do aumento da função da barreira intestinal (Ukena et al., 2007).

3.3.3.4. Produção de substâncias antibacterianas

As bactérias probióticas podem produzir substâncias antibacterianas que tem ação bacteriostática ou bactericida contra bactérias patogênicas (Lima et al., 2007). De acordo com Petri (2000), essas bactérias são capazes de produzir e liberar bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, os quais podem apresentar ação bacteriana contra patógenos.

Dentre as substâncias antibacterianas, os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácticas probióticas são responsáveis pela redução de pH do cólon, atuando assim como inibidores do desenvolvimento de bactérias patogênicas. Alguns exemplos dos ácidos graxos voláteis de

cadeia curta são: propiônico, acético, butírico e láctico, enquanto outros inibidores são: acetaldeído, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e aminas (Flemming e Freitas, 2005; Laughton et al., 2006; Vélez et al., 2007).

As bacteriocinas são compostos proteicos que inibem ou destroem certos tipos de patógenos intestinais, apresentando ação como antibióticos locais (Utyama, 2004; Flemming e Freitas, 2005; Silva et al., 2006). As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* participam da produção de bacteriocinas, como nisina, diplococcina, lactocidina e reuterina (Ferreira e Astolfi-Ferreira, 2006; Corr et al., 2007). Essas substâncias apresentam atividade inibitória contra bactérias Gram negativo e Gram positivo, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. (Jin et al., 1997; Lima et al., 2007).

As bactérias probióticas além de produzirem as substâncias antibacterianas citadas anteriormente, também são capazes de metabolizar os chamados ácidos biliares desconjugados que são derivados de sais biliares. Ácidos biliares desconjugados apresentam atividade antimicrobiana mais forte do que os sais biliares primários sintetizados pelo próprio organismo hospedeiro (Oelschlaeger, 2010).

3.3.3.5. Indução da produção de muco e defensinas

Alguns probióticos quando ingeridos são capazes de interagir com as células epiteliais intestinais e as células dendríticas (DC), dependendo da presença de uma camada de muco dinâmica. Probióticos podem ocasionalmente encontrar DC por duas vias: DC residentes que entram em contato com antígenos bacterianos luminiais da lâmina própria, passando os seus dendritos entre as células epiteliais intestinais no lúmen intestinal (Rescigno, 2001), e DC também podem interagir diretamente com bactérias que ganhem acesso à região da cúpula do tecido linfóide associado ao intestino, por meio de células epiteliais especializadas, denominadas células M (Artis, 2008). A interação das células hospedeiras por meio de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRR) podem detectar padrões moleculares associados a micro-organismos (mAMP), que estão presentes nas macromoléculas superficiais de bactérias probióticas e induzir uma certa resposta molecular. Algumas respostas moleculares de células epiteliais intestinais dependem do subtipo celular, por exemplo, células de Paneth produzem defensinas e células caliciformes produzem muco, que são substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra a invasão por micro-organismos patogênicos (Lebeer et al., 2010).

As mucinas formam uma camada de muco semelhante a um gel de proteção, proporcionando uma barreira contra bactérias, adjacente à superfície epitelial. Como tal, a camada de muco é uma parte integrante da estratégia de ignorância imunológica utilizada pelo hospedeiro para manter uma simbiose benéfica na relação hospedeiro-microbiota (Hooper, 2009). Alguns probióticos contribuem ativamente para esta proteção da barreira epitelial, pela indução da produção de mucina 2 (MUC2) e 3 (MUC3) (Mack et al., 2003). A indução da síntese de mucina pode proporcionar um nicho adicional para que os probióticos residam temporariamente no trato gastrointestinal e possam promover o contato com os seus receptores (Lebeer et al., 2010).

3.3.4. Gênero *Lactobacillus*

3.3.4.1. Grupo *Lactobacillus* spp.

O gênero *Lactobacillus* é descrito como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares e cocabacilos, Gram positivo e não esporulados, anaeróbias facultativas, ou microaerofílicas, ácido-tolerantes, estritamente fermentativos exigindo meio nutritivo para crescer e são catalase

negativo, mesmo que a atividade pseudocatalase algumas vezes possa estar presente em algumas cepas (Holzapfel et al., 2001; Axelsson, 2004). Esse gênero possui cerca de 217 espécies e 29 subespécies reconhecidas de bactérias (Euzéby, 2016). São quase onipresentes, sendo encontrados em ambientes onde os carboidratos estão disponíveis, tais como alimentos (laticínios, carne fermentada, massas fermentadas, legumes, frutas, bebidas), sistema respiratório, gastrointestinal e trato genital de seres humanos e animais, em esgotos e vegetais (Tamime, 2005; Buriti e Saad, 2007; Felis e Dellaglio, 2007).

De acordo com Garrity et al., (2004) e Felis e Dellaglio (2007), o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*.

Quanto às suas características fermentativas, os lactobacilos se dividem em grupos: obrigatoriamente homofermentativos; facultativamente heterofermentativos; e obrigatoriamente heterofermentativos. Os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos fermentam glicose somente em ácido lático e não fermentam pentoses ou gliconato. Alguns exemplos são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrüeckii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus salivarius*.

Os micro-organismos obrigatoriamente heterofermentativos fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono. Nesse grupo encontram-se as espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* (Holzapfel et al., 2001; Axelsson, 2004; Buriti e Saad, 2007). Além disso, os pesquisadores Reuter e Lerche, entre os anos de 1962 e 1969, identificaram alguns lactobacilos heterofermentativos como parte da população microbiana normal do trato gastrointestinal humano, que incluem principalmente *Lactobacillus reuteri* e, em menor grau, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus oris* e *Lactobacillus vaginalis* (Holzapfel et al., 2001).

O grupo dos lactobacilos facultativamente heterofermentativos fermentam hexoses em ácido-lático e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não a partir da glicose. Esses lactobacilos podem fermentar pentoses via uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos lático e acético. Espécies incluídas no grupo são *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus casei* (Axelsson, 2004; Vásquez et al., 2005; Buriti e Saad, 2007).

Os lactobacilos homofermentativos, que são típicos do hospedeiro humano são representados por três grupos: 1) o grupo *Lactobacillus acidophilus*, envolvendo linhagens que são atualmente reconhecidos como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus Johnsonii*; 2) *Lactobacillus salivarius*; e 3) o grupo *Lactobacillus casei*, envolvendo linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* (Holzapfel et al., 2001).

As espécies de probióticos do gênero *Lactobacillus* que possuem maior reconhecimento no meio científico são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* e ssp. *tolerans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius* (Saad, 2006).

3.3.4.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum foi designado originalmente como *Streptobacterium plantarum* por Orla-Jensen e Holland possuindo morfologia de bastonete, com tamanho de cerca de 0,9-1,2 x 1,0-8,0 µm, ocorrendo individualmente ou agrupado em cadeias curtas. É um lactobacilo anaeróbio, facultativamente heterofermentativo, cuja fermentação de hexoses por via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) resulta na formação dos ácidos D- e L-lático (Kandler e Waiss, 1986; Todorov e Melo Franco, 2010).

Estudos sorológicos demonstraram que a maioria das linhagens de *L. plantarum* contém ribitol e ácidos teicóico na parede celular, enquanto que outras BAL contêm usualmente um ácido teicóico glicerol no envelope da célula (Sharpe, 1981).

Essa BAL é uma linhagem mesofílica com a capacidade para crescer a temperaturas desde 15 °C até 45 °C, possuindo melhor desenvolvimento na presença de 4 a 6% de NaCl e com valores de pH entre 4 e 9. Devido a estas características, *L. plantarum* foi isolado com sucesso a partir de vários nichos ecológicos, tais como diferentes materiais vegetais, leite, produtos cárneos, peixe, águas residuais e do estômago e trato intestinal de humanos e animais (Kandler e Waiss, 1986; Somboon et al., 1992).

Esse micro-organismo possui várias aplicações na indústria de probióticos, por serem tolerantes a acidez, aos sais biliares, sobrevivendo a passagem pelo trato gastrointestinal, e sendo seguro em humanos e animais. Ele foi isolado a partir de diferentes produtos alimentares, como contaminante natural e tem sido usado como uma cultura iniciadora em vários processos de fermentação de alimentos, contribuindo para as propriedades sensoriais, sabor e textura. Além disso, esse lactobacilo é capaz de produzir compostos antimicrobianos, como bacteriocinas contribuindo para a segurança do produto final. Desde as últimas duas décadas, as propriedades probióticas para algumas amostras de *L. plantarum* foram amplamente pesquisadas (Todorov e Melo Franco, 2010; Sunanliganon et al., 2012).

Lactobacillus plantarum consegue sobreviver ao baixo pH do estômago e duodeno, resistindo aos efeitos dos ácidos biliares no intestino delgado superior, quando ingeridos, e colonizando o trato gastrintestinal temporariamente ligando-se a mucosa intestinal. A sua utilização como um tratamento para a síndrome do intestino irritável foi testada, e várias evidências sugerem os seus efeitos na redução da dor, distensão abdominal e flatulência (Bixquert, 2009). Além disso, Nissen et al. (2009) demonstraram por experimento *in vitro*, que *L. plantarum* auxiliou na melhora da integridade intestinal, na atividade metabólica das células intestinais e no estímulo às respostas imunes. Assim, um estudo comparativo demonstrou que esse probiótico induziu uma resposta pró-inflamatória apenas acima do nível limiar, o que poderia evitar um resultado inflamatório e para induzir em células epiteliais intestinais um elevado estado de alerta imunitário (Cammarota et al., 2009). A ingestão de *L. plantarum* também reduziu alguns sintomas gastrintestinais, como náusea e diarreia, durante o tratamento com antimicrobiano, de acordo com pesquisa realizada por Lonnermark et al. (2010). Os pesquisadores Qin et al. (2009) demonstraram que o tratamento com *L. plantarum* interrompeu o processo de infecção por *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), pela proteção às células epiteliais ao impedir alterações na morfologia da célula hospedeira, auxiliando contra os danos a integridade das células em monocamada Caco- 2 e diminuindo a permeabilidade macromolecular intestinal.

3.3.4.3. *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus se caracteriza como bastonetes curtos, Gram positivo, não esporulados, anaeróbios facultativos, crescendo melhor à temperatura de 30°C-40°C (Garrity et al., 2004). São encontrados em derivados de leite, principalmente em queijos artesanais, ou produzidos com leite sem tratamento térmico, no trato gastrintestinal e vaginal (Sena, 2000; Guedes Neto, 2004; Doron et al., 2005; Leão et al., 2015).

Efeitos benéficos na saúde tem sido atribuído ao *L. rhamnosus* GG, tais como a prevenção e tratamento da diarreia aguda em crianças, a prevenção da diarreia associada a antimicrobianos e a prevenção e tratamento da alergia e também auxiliam positivamente em outros distúrbios (Doron et al., 2005). Esse micro-organismo foi selecionado como potencial probiótico pela aderência e capacidade de colonização que contribuem para a modulação imune, a exclusão do patógeno, e maior contato com a mucosa por bactérias probióticas e, também, por fatores como a

resistência ao ácido biliar e a alta capacidade de acidificação do meio por ação de seu metabolismo de fermentação de carboidratos e produção de ácido láctico (Tuomola e Salminen, 1998; Tuomola et al., 1999). Deste modo, os probióticos fortificam a microbiota residente se tornando parte integrante da barreira mucosa, levando resistência à colonização contra os agentes patogênicos.

Lactobacillus rhamnosus receberam a posição de Qualificado de “Presunção de Segurança” ou “Qualified Presumption of Safety” (QPS), o qual é uma abordagem da avaliação do risco genérico a agentes biológicos notificados, destinados a simplificar as avaliações de risco em diferentes painéis científicos e Unidades, sendo aplicado pela Autoridade Européia para a Segurança dos Alimentos/EFSA (“European Food Safety Authority”) e, depois de uma longa história de uso seguro, foram considerados como Geralmente Reconhecido como Seguro/GRAS (“Generally Recognised as Safe”) (FAO/WHO, 2002; Tamime, 2002; De Vuyst et al., 2004; EFSA, 2007; Mattia e Merker, 2008).

Em estudos comparativos, *L. rhamnosus* GG obteve boa atuação em experimentos de aderência *in vitro* com células epiteliais e mucosa, e *in vivo* sendo capaz de aderir à mucosa intestinal humana e podendo persistir durante mais de uma semana após a ingestão oral por adultos saudáveis (Alander et al., 1999). Com a administração oral de *L. rhamnosus* GG por mulheres grávidas foi relatada a colonização desses lactobacilos nos bebês por aproximadamente 24 meses de idade (Shultz et al., 2004). Além disso, *L. rhamnosus* GG também é capaz de colonizar a boca, sendo cultivados a partir da saliva durante duas semanas, após a ingestão e promovendo efeitos benéficos contra o desenvolvimento de cáries dentárias em crianças (Meurman et al., 1994; Nase et al., 2001).

Szajewska et al. (2013) avaliando o potencial de *L. rhamnosus* GG no tratamento de diarreia aguda em crianças, também encontraram eficácia com o uso do probiótico na redução da duração de diarreia, quando utilizado em uma dose diária acima de 10^{10} UFC. Passariello et al. (2014) constataram que o consumo de *L. rhamnosus* relaciona-se com a redução da duração de diarreia e na frequência de evacuações no tratamento de diarreia infecciosa em indivíduos de todas as idades. De acordo com Bajaj et al. (2014), um dos fatores que permite a adesão desse micro-organismo à mucosa intestinal e promove o deslocamento dos patógenos e a estimulação do sistema imunológico é a presença de pili.

O probiótico *L. rhamnosus* aumenta a produção de citocinas por células T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) em camundongos sensibilizados com antígeno e aumenta a imunidade de camundongos contra *Escherichia coli* O157:H7 e com infecção por *Salmonella* spp. (Gill et al., 2001; Cross et al., 2002; Shu e Gill, 2002).

3.4. Gênero *Escherichia*

O médico austríaco Theodor Von Escherich isolou, em 1885, pela primeira vez, *Escherichia coli* de amostras fecais coletadas de crianças com diarreia. Em anos posteriores, os pesquisadores relataram que *E. coli* poderia ser isolada em amostras fecais, sendo considerada como micro-organismo presente na microbiota entérica normal do homem e dos animais de sangue quente (Correa e Correa, 1992).

De acordo com Tortora et al. (2012) *Escherichia coli* faz parte da “ordem *Enterobacteriales*, que são bastonetes Gram negativo anaeróbios facultativos e que se locomovem por flagelos peritríqueos. Morfologicamente, os bastonetes são retos e habitam o trato gastrointestinal do homem e de outros animais. Possuem fímbrias que ajudam na aderência a superfícies ou membranas mucosas. Os *pili* sexuais especializados auxiliam na troca de informação genética entre células, que frequentemente inclui resistência a antibióticos”. As *E. coli* típicas são micro-organismos que fermentam a lactose, com produção de ácido e gás, produzem ácido a partir da glicose obtendo resultado positivo na prova de vermelho de metila

(VM); produzem indol a partir do triptofano; produzem a enzima β -galactosidase; resultados positivos para a utilização de mucato, de fenil-metil, de tartarato; não produzem H₂S (TSI/ Ágar Tríplice Açúcar e Ferro), urease, KCN e alanina desaminase; não produzem acetoina a partir da metabolização da glicose, resultando em resultado negativo no teste de Voges-Proskauer (VP) e não utilizam citrato (Trabulsi et al., 2004; Madigan et al., 2010).

As categorias de *E. coli* patogênicas se dividem em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* meningite neonatal (NMEC), *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (Croxen e Finlay, 2010; Saviolli, 2010).

3.4.1. *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7

Escherichia coli O157: H7 é uma bactéria membro de um grupo de bactérias patogênicas de *E. coli* (conhecida como *E. coli* enterohemorrágica ou EHEC) que colonizam o trato gastrointestinal e causam uma condição conhecida como colite hemorrágica ou diarreia com sangue. O sorotipo O157: H7 produz toxina Shiga (Stx) e está envolvido na diarreia e doenças transmitidas por alimentos. Este grupo de *E. coli* é o único definido por sua capacidade de produzir a toxina Shiga do tipo 1 (Stx1), toxina Shiga tipo 2 (Stx2) ou ambas as toxinas (bem como as variantes destas). Estas bactérias são associadas ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica (SHU) que pode levar à insuficiência renal, particularmente em crianças (Banatvala et al., 2001; Rivas et al., 2006). A SHU leva a quadros de anemia hemolítica microangiopática, insuficiência renal aguda e trombocitopenia (Nataro e Kaper, 1998; Clarke, 2001; Ochoa e Cleary, 2003).

A rota de transmissão das infecções por EHEC é fecal-oral, por meio de água e alimentos contaminados, principalmente carnes e derivados bovinos, produtos lácteos e derivados, alface, alface e sucos. Possui período de incubação de um a seis dias, podendo chegar a quatorze dias (Swerdlow et al., 1992; Baker et al., 1999; Hilborn et al., 1999; Clarke, 2001; Smith et al., 2004).

Alguns estudos explicam os efeitos protetores de espécies probióticas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* contra a toxina Shiga de *E. coli* O157: H7, atuando na redução da atividade citotóxica da bactéria ou por uma sub-regulação da expressão do gene Stx, sendo este último efeito atribuído a elaboração de ácidos láctico e acético pelos lactobacilos (Kim et al., 2006; Carey et al., 2008). Alternativamente, moléculas específicas na superfície bacteriana, como certos copolímeros galacto-trealose, ou lipopolissacarídeos modificados podem ligar-se a Stx realizando assim uma atividade neutralizante (Pinyon et al., 2004; Neri et al., 2007).

3.4.2. *Escherichia coli* enteroinvasiva

Escherichia coli enteroinvasiva ou EIEC é transmitida por meio da via fecal-oral, com apenas uma pequena concentração. A infecção pode ocorrer por ingestão de alimentos e água contaminados ou por vetores mecânicos, como moscas. Os surtos têm sido associados com hambúrguer de carne e leite não pasteurizado (O'Sullivan et al., 2007).

Após a ingestão de EIEC os organismos invadem as células epiteliais do intestino, resultando em uma forma leve de disenteria, muitas vezes confundida com a disenteria causada por espécies de *Shigella*. A doença é caracterizada pelo aparecimento de sangue e muco nas fezes de indivíduos infectados (O' Sullivan et al., 2007). A disenteria causada por EIEC geralmente ocorre dentro de 12 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados. A doença é caracterizada por cólicas abdominais, diarreia, vômitos, febre, calafrios e um mal-estar

generalizado, sendo geralmente auto-limitada, sem complicações conhecidas. A seqüela comum associada com a infecção, especialmente em casos pediátricos, é a síndrome hemolítica-urêmica (SHU) (FDA/CFSA, 2015).

A doença causada por esta bactéria é caracterizada pela destruição do epitélio do cólon causada pela resposta inflamatória induzida pela invasão da mucosa por bactérias (Parsot, 2005).

A EIEC é bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente semelhante à *Shigella* spp. Ao contrário de *E. coli* típica, essas espécies são imóveis e não fermentam a lactose ou fermentam tardiamente (Silva et al., 1980; Nataro e Kaper, 1998; Feng e Weagant, 2002; Lan et al., 2004).

3.5. Leites fermentados

A história dos produtos lácteos fermentados está relacionada com o consumo de leite e do seu armazenamento. Também está ligada ao nomadismo e aos hábitos alimentares em diferentes partes do mundo. Esses produtos variam muito de acordo com cada país e além dos produtos tradicionais, existem os produtos espumantes, os muito ácidos ou mesmo produtos que possuem diferentes teores alcóolicos. Em alguns países, existem os produtos "regionais", que são feitos do leite de animais economicamente disponíveis no local (égua, camelos, búfalas, iaques e vacas). Todavia, na maioria dos países, esses produtos fermentados são feitos a partir do leite de vaca. Os tipos de fermentos também diferem, uma vez que dependem de como os produtos originais foram preparados. A noção de saúde em torno desses produtos é muito antiga, sendo ligada ao consumo de Kefir por habitantes da Caucásia e ao consumo de Kumys por exércitos de Genghis Khan (Bourlioux, 2007).

O processo fermentativo que ocorre nos leites fermentados modifica as características sensoriais, o valor nutritivo do leite, leva ao desenvolvimento de uma gama de derivados lácteos e aumenta o prazo de validade (Ordóñez, 2005; Gallina et al., 2012). Para as indústrias de laticínios o processo de fermentação é uma das etapas de grande importância, pois ocorre o desenvolvimento do aroma e sabor, associados diretamente às atividades fermentativas dos micro-organismos (Jay, 2005; Rocha et al., 2008).

“Entende-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade”. Entre os tipos de leites fermentados estão o iogurte, o leite acidófilo, o Kefir, o Kumys e a coalhada (Brasil, 2007).

Os ingredientes obrigatórios incluem o leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura e os cultivos de bactérias lácticas e/ou cultivos de bactérias lácticas específicas. Entre os ingredientes opcionais estão o leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou “butter oil”, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, cultivos de bactérias lácticas subsidiárias. Outros ingredientes opcionais não-lácteos deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final, como por exemplo a açúcar. Os amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto final (Brasil, 2007).

Os requisitos físico-químicos e microbiológicos, segundo os Padrões de Identidade e Qualidade dos leites fermentados (Brasil, 2007) encontram-se nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Requisitos físico – químicos oficiais para inspeção de leites fermentados

Matéria gorda láctea (g/100g) Norma FIL 116 A:1987				Acidez (g de ácido lático/100g) Norma FIL 150:1991	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado		
Min. 6,0	3,0 a 5,9	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Min. 2,9

Fonte: Brasil (2007)

Quadro 2. Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados

Micro-organismos	Critério de aceitação	Norma
Coliformes/g (30°C)	N=5 c=2 m=10 M=100	FIL73A:1985
Coliformes/g (45°C)	N=5 c=2 m<3 M=10	APHA 1992c.24
Bolores e leveduras/g	N=5 c=2 m=50 M=200	FIL94B:1990

Fonte: Brasil (2007)

3.5.1. Leite fermentado de búfala

De acordo com a definição do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2011), leite de búfala é a secreção láctea normal, praticamente livre de colostro, obtida pela ordenha completa de uma ou mais búfalas sadias.

No Brasil, o rebanho bubalino está estimado em torno de 1,15 milhão de cabeças, sendo a região Norte, com 720 mil animais, a maior produtora do País, com destaque para o Pará, que responde por 39% do rebanho nacional. Em seguida, aparecem o Nordeste e o Sudeste, com 135 e 104 mil cabeças, respectivamente (MAPA, 2015). Estima-se que cerca de 10% de todo o leite produzido no mundo é de origem bubalina. O continente asiático contribui com 96% da produção mundial do leite de búfala, sendo que 92,12% é produzido na Índia, China e Paquistão, que são responsáveis por aproximadamente 78% da população mundial de búfalos. O destaque do continente asiático é a Índia, com 55% do leite produzido bubalino (Silva et al., 2003; IBGE, 2006; Santa Rosa, 2011).

O leite bubalino, em comparação com o leite bovino, apresenta maior conteúdo de sólidos totais, sendo uma boa indicação para a preparação de derivados, como queijos, doces, iogurte e leites fermentados, possuindo alto valor nutritivo e maior rendimento industrial (de 39 e 40% a mais do que o leite de vaca), o que gera maior lucro para os laticínios (Hühn et al., 1984; Benevides, 1998; Hühn et al., 1991; Verruma e Salgado, 1994; Ahmad et al., 2013). Além disso, um estudo feito por Sheehan e Phipatanakul (2009) indicou que as pessoas alérgicas ao leite de vaca são mais tolerantes ao leite de búfala. O leite de búfala contém praticamente todos os componentes benéficos encontrados nos outros leites, como as proteínas, peptídios, ácidos graxos, vitaminas e outros componentes bioativos. Esse leite possui maiores teores de proteína total, ácidos graxos de cadeia média, ácido linoléico conjugado (CLA), retinol e tocoferol do que o leite de vaca (Ahmad et al., 2013).

O teor total de colesterol de leite de búfala é menor do que o encontrado no leite de vaca (275 mg versus 330 mg por 100 g de gordura), mesmo sendo mais calórico do que o leite de vaca (1,5 a 1,9 vezes mais calórico). A massa do queijo feito com leite de búfala retém menos água durante a ação do coalho do que o leite de vaca, pois as micelas de caseína do leite bubalino são maiores (Ganguli, 1979). O leite de búfala é mais rico em cálcio (1,99g/kg versus 1,17 g/kg) e Magnésio (0,18g/kg versus 0,11 g/kg) do que o leite de vacas, porém, é mais pobre em sódio, potássio e cloro (De Franciscis e Di Palo, 1994; Amaral et al., 2005b). Esse leite também apresenta 25,5% de aminoácidos essenciais a mais do que o leite de vaca (Verruma e Salgado, 1994). No quadro 3 encontram-se dois estudos comparativos, realizados no Brasil, entre a composição do leite de búfalas e de vacas.

Em relação às características físico-químicas do leite bubalino, a densidade está entre 1,025 e 1,047 g/mL; pH entre 6,41 e 6,47; acidez titulável entre 0,14 e 0,20 gramas de ácido láctico por 100 mL de leite (o elevado teor de proteínas, principalmente a caseína justifica a alta acidez); crioscopia entre -0,531 e -0,548°C; teor de sólidos totais em torno de 17%, teor de proteína entre 3,6 e 5,26%, teor de gordura variando entre 5,4 e 8%; minerais entre 0,79 e 0,83% e, desse total, o cálcio pode alcançar até 25% (Furtado, 1980; Coelho et al., 2004; Bastianetto et al., 2005; Cunha Neto et al., 2005). O quadro 4, adaptado de Amaral (2005a) apresenta os valores médios dos constituintes do leite de búfalas encontrados em trabalhos realizados no Brasil e em outros países.

A Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do Estado de São Paulo estabeleceu na Resolução n° 24, os valores de pH: entre 6,40 e 6,90, acidez Dornic: 14 a 23 °D, teor de gordura: mínimo de 4,5%, teor de extrato seco desengordurado: mínimo de 8,57%, densidade a 15 °C: de 1,028 a 1,034 e índice crioscópico: -0,520 a -0,570 °C para o leite bubalino normal (São Paulo, 1994). Os teores de lactose, proteína e sólidos totais não possuem valores estabelecidos pela SAA, porém nessa Resolução também foi feita a proibição de adição de leite de outras espécies de animais ao leite de búfala. Não há legislação específica para produtos derivados do leite de búfala. No caso de leites fermentados, os teores de proteína e de gordura encontram-se dentro dos recomendados para leite de vaca, no Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados da Resolução n° 5 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2000).

Quadro 3. Dados comparativos entre o leite de bubalinos e bovinos, quanto à composição de seus constituintes, a partir de dois trabalhos publicados no Brasil

Parâmetros determinados	Hühn et al. (1982)*		Verruma e Salgado (1994)**	
	Leite de búfalas (Mediterrânea)	Leite de vacas (Sindi)	Leite de búfalas (Jafarabadi)	Leite de vacas (Mestiças)
Densidade (g/cm ³ a 15°C)	1,0327	1,0320	-	-
Gordura (%)	6,85	4,77	8,16	3,68
Proteína (%)	3,68	2,60	4,50	3,70
Cinzas (%)	0,83	0,72	0,70	0,70
Sólidos totais (%)	17,50	12,19	17,00	12,00
Lactose (%)	3,83	3,74	-	-
Umidade (%)	-	-	83,00	88,00
Vitamina A (U.I.)	-	-	204,27	185,49
Calorias por mL	-	-	104,29	62,83

* Metodologias: Densidade- Lactodensímetro; Gordura-Gerber; Proteína-Kjeldahl; Lactose-Licor Fehling.

** Metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (1990).

Fonte: (Amaral et al., 2005b)

Quadro 4. Valores médios dos constituintes do leite de búfalas no Brasil e em outros países

Autor	País	Raça	Gordura (%)	Proteína (%)	Sólidos totais (%)	Lactose (%)
Swaminathan e Parpia (1968)	Índia	-	7,50	3,80	-	4,40
Eltawil et al. (1976)	Egito	Egípcia	6,63	3,99	16,48	-
Alim (1978)	Egito	Egípcia	6,57	-	15,66	-
Furtado (1980)	Brasil	Murrah x Mediterrânea	6,60	4,79	17,09	5,52
Sharma et al. (1980)	Índia	Jafarabadi	7,40	4,01	-	-
		Meshana	7,40	3,92	-	-
		Murrah	7,40	3,94	-	-
		Mestiços	7,30	4,01	-	-
Pandey et al. (1986)	Índia	Murrah	7,23	4,33	17,32	-
Antunes et al. (1988)	Brasil	Murrah	6,15	4,10	16,60	-
Dubey e Gupta (1989)	Índia	-	6,80	3,90	16,26	4,37
Rahman e Gill (1990)	Índia	Murrah	7,33	-	16,21	-
Fraciscis e Di Palo (1994)	Índia	Mediterrânea	8,10	4,54	-	-
Spanghero e Susmel (1996)	Índia	Mediterrânea	8,55	4,27	-	5,15
Dubey et al. (1997)	Índia	Murrah	7,65	3,81	17,01	4,83
Kholif (1997)	Egito	-	7,13	3,76	17,07	5,08
Peeva (1997)	Bulgária	Murrah e mestiças da Bulgária	7,93	4,50	17,94	4,95
Macedo et al. (1997)	Brasil	Mediterrânea	6,59	4,13	17,01	-
Faria et al. (1997)	Brasil	Mediterrânea	6,12	3,80	-	-
		Jafarabadi	6,32	3,66	-	-
Tonhati (1999)	Brasil	Murrah	7,07	4,42	-	-
		Mediterrânea	6,14	3,83	-	-
		Jafarabadi	6,82	3,96	-	-
		mestiços	6,93	3,81	-	-
Fundora et al. (2001)	Cuba	Murrah	6,98	5,40	15,55	-
Tzankova (2001)	Bulgária	Murrah da Bulgária	7,36	4,19	17,47	5,08
Peeva (2001)	Bulgária	Murrah da Bulgária	7,94	4,49	17,72	4,86
Duarte (2001)	Brasil	Murrah e mestiços	6,96	4,20	17,42	5,19
Mesquita et al. (2002)	Brasil	Média geral de raças	6,80	4,01	17,30	5,52
Catillo et al. (2002)	Itália	Mediterrânea	9,10	5,06	-	-
Amaral et al. (2004)	Brasil	Média geral de raças	6,83	4,19	17,19	4,93

Patiño (2004)	Argentina	Murrah x Mediterrânea	7,22	3,85	16,35	4,49
----------------------	-----------	-----------------------	------	------	-------	------

Fonte: (Amaral, 2005a)

Os trabalhos envolvendo a produção de leites fermentados por probióticos usando leite de búfala como matriz são escassos. Faria et al. (2006b) demonstraram que o leite de búfala fermentado por *L. casei* por 18 horas não apresentou os parâmetros requeridos para o produto, enquanto os leites de búfala fermentados por 22 e 24 horas apresentaram acidez e pH adequados. A viabilidade de *L. casei* na estocagem inicial foi maior que 9 log UFC/ mL e na final, maior que 8 log UFC/mL, com influência da acidez. Em outra pesquisa realizada também por Faria et al. (2006a) com leite de búfala fermentado por *L. casei* utilizando leite desnatado e suplementado com *B. longum*, os resultados encontrados para acidez inicial foram de 0,69% e pH de 4,86, viabilidade de *L. casei* inicial 11,00 log UFC/mL e de *B. longum* 10,46 log UFC/mL. Após 30 dias de estocagem sob refrigeração, a acidez e o pH estavam adequados e a viabilidade de *L. casei* e de *B. longum* foram maiores que 9,00 log UFC/mL. Os teores de proteína, carboidrato e gordura, respectivamente foram de 3,63%, 21,68% e 0,10%. Além disso, na análise sensorial o produto apresentou boa aceitação pela escala hedônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Culturas de bactérias ácido lácticas

As espécies de lactobacilos utilizadas nesta tese foram isoladas e caracterizadas no Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal/DTIPOA da Escola de Veterinária da UFMG. Os lactobacilos foram isolados em condições de aerobiose, de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra no estado de MG e identificados ao nível molecular por PCR ARDRA 16S-23S (Tisala-Timisjarvi e Alatossava, 1997) no trabalho de Resende et al. (2011). As espécies de lactobacilos foram testadas quanto ao seu potencial probiótico *in vitro* por Costa et al. (2013), com testes de antagonismo contra micro-organismos patogênicos e não-patogênicos de referência (**Anexo I**); susceptibilidade a antimicrobianos; (**Anexo II**) sensibilidade ao suco gástrico e sais biliares (**Anexo III**). As amostras selecionadas foram das seguintes espécies: *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1. As culturas foram mantidas a -30°C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco, Detroit, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. As ativações foram feitas em caldo MRS, a 37°C, por 18 horas, em aerobiose.

4.2. Micro-organismos patogênicos reveladores da atividade antagonista

As amostras utilizadas foram: *Escherichia coli* EIEC CDC EDL 1284 e *Escherichia coli* EHEC O157:H7 CDL EDL-933, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz (RJ). As amostras foram ativadas duas vezes em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Detroit, EUA), por 18 horas, a 37°C, em aerobiose, para uso nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

4.3. Teste de antagonismo *in vitro* contra *E. coli* EHEC e EIEC

O teste de antagonismo *in vitro* das bactérias ácido-láticas via difusão em camada dupla de ágar, contra micro-organismos patogênicos reveladores foi realizado em triplicata, com duas repetições, adaptando-se a técnica de Tagg et al. (1976). Os *Lactobacillus* foram ativados duas vezes em 5mL de caldo MRS (Difco, Detroit, EUA) a 37°C, por 18h, sob aerobiose. Após dois cultivos, 5µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS, sendo incubadas a 37°C, por 48h, sob aerobiose, com o objetivo de formar o “spot”, que representa o seu crescimento. Em seguida, as bactérias produtoras foram eliminadas pela adição de clorofórmio às tampas das placas, com ação do vapor do clorofórmio por 30 minutos, sendo posteriormente mantidas sob a luz UV por 30 minutos. *E. coli* EHEC e *E. coli* EIEC foram ativadas duas vezes em caldo BHI incubado a 37°C, por 18h, em aerobiose. Logo após, 10µL dos cultivos foram adicionados em tubos contendo 4mL de ágar BHI (Difco, Detroit, EUA) semi-sólido (0,75% de ágar), que foram vertidos nas camadas de ágar solidificado. Após 48h de incubação a 37°C em aerobiose, mediu-se o halo de inibição formado pelo crescimento das bactérias patogênicas ao redor do “spot” utilizando um paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil). As médias dos tratamentos, considerando o valor dos halos (mm) de inibição para o teste de antagonismo *in vitro spot-on-the-lawn* foram comparadas.

4.4. Animais para o teste *in vivo*

Foram utilizados camundongos convencionais, de 21 a 27 dias de idade, machos, da linhagem BALB/c JUnib. Esses animais foram provenientes do Biotério Central da UFMG. Todos os animais convencionais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia (de nível NB2) em mini isoladores do modelo ALE.MIL.01.03 da marca Alesco (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil).

Os animais convencionais, durante a experimentação, receberam ração sólida *ad libitum* (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água filtrada e foram mantidos em estante ventilada da marca Alesco com controle de umidade (60-80%), de temperatura (22-24°C) e com ciclo diurno/noturno de 12 horas.

A utilização da experimentação animal desse projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 80/2015 (**Anexo IV**). Os experimentos nos animais foram conduzidos respeitando as normas do “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2015).

4.5. Teste de antagonismo *in vivo* contra *E. coli* EHEC e EIEC

4.5.1 Desafio dos camundongos com os patógenos

Os inóculos de *E. coli* EHEC e EIEC foram feitos a partir de uma cultura desenvolvida por 18 horas a 37°C, submetida ou não a diluições sucessivas em salina tamponada esterilizada, obtendo-se soluções finais a 10^9 e 10^7 UFC/mL, medidas pela escala Mc Farland. Os animais Balb/c dos grupos EHEC e EIEC e dos grupos desafio receberam 10^8 UFC/mL de *E. coli* EHEC ou EIEC no dia do desafio, por via intragástrica. A confirmação da viabilidade do inóculo foi feita em ágar MacConkey (Difco) após 18 horas de incubação a 37°C, em aerobiose (Martins et al., 2010).

4.5.2. Tratamento dos camundongos

Os animais convencionais (da linhagem BALB/c) foram divididos em nove grupos compostos por seis animais cada, que receberam diferentes tratamentos, por via intragástrica, durante quatorze dias. O protocolo de tratamento e infecção foi dividido em três fases: tratamento pré-desafio (1° ao 6° dia), desafio (7° dia) e tratamento pós-desafio (8° ao 14° dia), conforme descrito na Tabela 1. Os animais foram eutanasiados logo após o tratamento, no 15° dia. Os camundongos receberam dose diária de 10^9 UFC/mL de leite fermentado inoculado com cada lactobacilo selecionado (B7 e D1), medido pela escala McFarland e os animais do grupo controle receberam 0,1 mL de leite estéril não fermentado, via intragástrica (por gavagem- administração oral com acesso ao esôfago), 6 dias antes do desafio com a bactéria patogênica e até o final do período experimental, de 14 dias (Martins et al., 2010).

Tabela 1. Grupos de estudo com seis camundongos Balb/C em cada e esquema de tratamento com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 e desafio com *E. coli* EHEC ou *E. coli* EIEC.

GRUPOS	Dias de (Tratamento)		
	Tratamento Pré-Desafio	Desafio	Tratamento Pós-Desafio
Grupo controle- (leite estéril)	6 (0,1 mL de leite fermentado estéril)	1 (0,1 mL de leite fermentado estéril)	7 (0,1 mL de leite fermentado estéril)
Grupo <i>L. plantarum</i> B7	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	1 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)
Grupo <i>L. rhamnosus</i> D1	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	1 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)
Grupo EHEC	7 (0,1 mL de leite fermentado estéril)	1 (10 ⁸ UFC/mL de EHEC)	7 (0,1 mL de leite fermentado estéril)
Grupo EIEC	7 (0,1 mL de leite fermentado estéril)	1 (10 ⁸ UFC/mL de EIEC)	7 (0,1 mL de leite fermentado estéril)
Grupo EHEC x <i>L. plantarum</i> B7	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	1 (10 ⁸ UFC/mL de EHEC e 10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)
Grupo EHEC x <i>L. rhamnosus</i> D1	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	1 (10 ⁸ UFC/mL de EHEC 10 ⁸ e 10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)
Grupo EIEC x <i>L. plantarum</i> B7	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	1 (10 ⁸ UFC/mL de EIEC 10 ⁸ e 10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado B7)
Grupo EIEC x <i>L. rhamnosus</i> D1	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	1 (EIEC 10 ⁸ e 10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)	7 (10 ⁹ UFC/mL de leite fermentado D1)

4.5.3. Determinação da translocação de *E. coli* EHEC e EIEC em camundongos Balb/c

Amostras de baço e fígado foram pesadas e submetidas a diluições decimais em salina peptonada esterilizada (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona). Diluições seriadas foram realizadas e uma alíquota de 0,1 mL das diluições 10⁻³ e 10⁻⁵ plaqueadas por *spread plate* em ágar MacConkey (Acumedia, Baltimore, Maryland, EUA), para detecção e enumeração de *E. coli* EHEC ou EIEC, por até 24 horas de incubação a 37°C, em aerobiose. Adicionalmente, alíquotas

de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar MRS (Difco) por até 48 h a 37°C, em aerobiose, para enumeração de lactobacilos (Bambirra et al., 2007).

Os resultados foram expressos como média do log de UFC/g de tecido, nos seis animais por grupo (sendo um grupo controle; um grupo para *E. coli* EHEC; um grupo para *E. coli* EIEC; dois grupos controle para cada espécie de *Lactobacillus*; dois grupos para *E. coli* EHEC x *Lactobacillus*; dois grupos para *E. coli* EIEC x *Lactobacillus* – totalizando nove grupos no total) (Martins et al., 2010).

4.6. Preparo e análises dos leites fermentados

4.6.1. Análise do leite de búfala *in natura*

O leite de búfala foi coletado de três ordenhas manuais distintas realizadas na Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo e foi imediatamente transportado sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA da EV-UFGM. Quando chegou no laboratório, o leite foi homogeneizado por agitação manual com haste de aço inox para colheita de amostras e com vistas à realização das seguintes análises: índice crioscópico (IC); percentuais de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (ST), contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS). As amostras, em triplicata, foram acondicionadas em frascos com comprimido de bronopol® para as análises de composição do leite e CCS e em frascos com comprimido de azidiol para análise de CBT. As análises da composição físico-química e microbiológica dos leites foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFGM (LabUFGM).

4.6.2. Teste de inibidores de crescimento microbiano

O leite de búfala foi coletado de três ordenhas distintas realizadas na Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo e foram analisados em triplicata pelo método T (TTC) (Neal e Calbert, 1955), a fim de se confirmar a ausência de inibidores de crescimento bacteriano, uma vez que esta matéria prima seja utilizada para produção de leites fermentados por culturas bacterianas, objeto deste estudo.

Cultura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* foi inoculada às amostras, na proporção 1:1, e estas foram incubadas em estufa por duas horas a 45 °C. Após essa incubação, 0,3 mL do reagente 2, 3, 5 – trifeniltetrazolium (TTC), em diluição 1:25 foi adicionado ao tubo, que foi novamente incubado na estufa a 45°C, por mais 30 minutos. O metabolismo bacteriano foi observado a partir da mudança de cor dos tubos, sendo róseo indicativo de crescimento bacteriano.

4.6.3. Curvas de fermentação / crescimento

A curva de fermentação do leite de búfala adicionado de *L. plantarum* B7 ou *L. rhamnosus* D1 foi obtida pelas determinações do pH e da enumeração de *Lactobacillus* (UFC/g) em meio ágar MRS (Difco, Detroit Michigan, EUA), em intervalos de tempo de duas horas, desde o tempo zero (adição do inóculo) até a coagulação dos leites desnatados, realizados em triplicata.

O tempo de fermentação também foi determinado durante a curva de fermentação, considerando como momento inicial a adição do inóculo ao leite e como término a formação do coágulo, o início da sinérese e o pH em torno de 4,5 a 5,0.

4.6.4. Preparo

Na elaboração do leite fermentado, 100 µL das culturas congeladas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* (isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra) foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5mL de caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, EUA). Estes tubos contendo as culturas *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para garantir a ativação das culturas.

Após esse período, 2,5% de cada cultura ativada, com contagem das BAL por plaqueamento, foram inoculados em recipientes contendo leite pasteurizado, que foi anteriormente adicionado de sacarose a 8% e submetido a tratamento térmico a 110°C por 10 minutos. Os erlenmeyers adicionados de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por tempo necessário até a coagulação do leite, com controle do pH entre 4,5 e 5,0. Os dois produtos fermentados constituíram os inóculos para a elaboração dos leites fermentados.

Estes inóculos foram adicionados numa concentração igual a 2,5% em recipientes de 500mL e 1000mL contendo leite de búfala, adicionado de sacarose a 8% e tratado termicamente a 110°C por 10 minutos. Os leites de búfala foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até a coagulação. Após a coagulação e pH na faixa de 4,5 a 5, os produtos fermentados foram armazenados sob refrigeração a $4-7^{\circ}\text{C}$. Os recipientes contendo 500mL de leites fermentados foram utilizados nas análises físico-químicas e microbiológicas e os recipientes com 1000mL nas análises sensoriais. Esse procedimento permitiu que cada frasco fosse retirado da geladeira e analisado no momento desejado.

4.6.5. Análises físico-químicas dos leites fermentados

O leite fermentado foi armazenado $4-7^{\circ}\text{C}$ para realização de análises físico-químicas e microbiológicas previstas no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados (Brasil, 2007).

As análises físico-químicas realizadas foram: determinações de pH com auxílio de pHmetro digital (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil), teor percentual de gordura pelo método de Gerber, (Brasil, 2005), teor percentual de proteínas pelo método de Micro-Kjedahl em equipamento Tecnal TE012 (Piracicaba, SP, Brasil), de acordo com Brasil (2006). Todas as análises foram realizadas em quadruplicata nos dias 1, 14 e 28 de estocagem.

4.6.6 Avaliação microbiológica dos leites fermentados

As análises foram realizadas nos dias 1, 13 e 27 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a $4-7^{\circ}\text{C}$.

4.6.6.1. Enumeração de lactobacilos

Para as contagens dos micro-organismos foram feitas diluições decimais seriadas de (10^{-5} a 10^{-7}) dos leites fermentados produzidos, em salina peptonada (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona). Em seguida, alíquotas de 0,1mL das diluições selecionadas foram incorporadas ao ágar MRS (Difco, Detroit, Michigan, EUA) e incubadas sob aerobiose. A temperatura de incubação foi de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Após esse período, a enumeração dos micro-organismos foi feita pela média e multiplicação do número de colônias formadas na placa pelo inverso da diluição (IDF, 1997).

4.6.6.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

A pesquisa de coliformes totais e termotolerantes foi feita utilizando o método do Número Mais Provável (NMP) (Brasil, 2003). Na Prova Presuntiva, as diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} foram inoculadas em triplicata em tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio triptona e tubos de Durhan invertidos. Estes tubos foram incubados a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. A identificação da presença de gás nos tubos de Durhan indica resultado positivo e requer a realização do teste confirmatório em caldo verde brilhante bile 2% lactose para coliformes totais e caldo EC para coliformes termotolerantes.

4.6.6.3. Pesquisa de bolores e leveduras

A pesquisa de bolores e leveduras foi feita de acordo com a Instrução Normativa 62 (Brasil, 2003). Foram inoculados e espalhados com auxílio da alça de Drigalski, 0,1mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} sobre a superfície do ágar batata glicose 2%, acidificado a pH 3,5. As placas foram incubadas, sem inverter, a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco a sete dias.

4.6.6.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., 25mL de cada leite fermentado foram transferidos, assepticamente, para frascos contendo 225 mL de salina peptonada tamponada 1%, para realização do pré-enriquecimento. Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C , após permanência em temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, foi realizada a fase de enriquecimento seletivo em caldo selenito cistina (Acumedia, Baltimore, Maryland, EUA) e caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia), para os quais foram transferidos 1,0 mL e 0,1 mL do pré-enriquecimento, respectivamente. Os tubos foram mantidos em banho-maria a $41 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação foi feita a técnica de isolamento em meios sólidos seletivos diferenciais, o ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) (Acumedia), o ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Acumedia) e o ágar Hecktoen entérico (He) (Acumedia). De cada tubo do enriquecimento seletivo, foram obtidas três placas para isolamento, uma para cada ágar utilizado. As placas foram incubadas por 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (Brasil, 2003).

4.6.6.5. Pesquisa de *Staphylococcus* spp.

Para a enumeração de *Staphylococcus* spp. foram inoculados e espalhados com auxílio da alça de *Duralski*, 0,1mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} sobre a superfície do ágar Baird Parker (Acumedia) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas por 48 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, sob aerobiose (Brasil, 2003).

4.6.7. Análise Sensorial

A análise sensorial de aceitação dos leites fermentados por lactobacilos foi realizada por 51 provadores individualmente, nos dias 14 e 28 de estocagem, em três repetições, os participantes eram não treinados e maiores de idade como estudantes, professores e funcionários da UFMG que tinham interesse e/ou hábito de consumir leite fermentado, de acordo com o experimento realizado por Viegas et al. (2010). As amostras de leites fermentados foram codificadas com sequências aleatórias de dígitos e servidas aos provadores, dentro de cabines individuais, em porções de 25 mL em copos de plástico incolores a temperatura não superior a 10°C . Os provadores receberam ficha contendo escala hedônica de cinco pontos, que solicitou a expressão

do grau de aceitação dos produtos provados em: 1= Desgostei muito, 2= Não gostei, 3= Não gostei nem desgostei, 4= Gostei, 5= Gostei muito, para que os dados fossem analisados estatisticamente. Os provadores também foram avaliados quanto à intenção de compra dos leites fermentados, indicando se comprariam ou não cada um dos produtos avaliados. A realização das análises sensoriais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob número do projeto: CAAE- 48320015.1.0000.5149 (**Anexo V**).

4.7. Delineamento Experimental

O programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas.

As médias dos tratamentos considerando o valor dos halos (mm) de inibição para o teste de antagonismo *in vitro* “*spot-on-the-lawn*” demonstraram resultado não normal, portanto, foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

Para comparação das médias dos tratamentos, considerando os parâmetros físico-químicos, durante os períodos de estocagem dos leites fermentados, a análise estatística utilizada foi o teste de Two-way ANOVA, em nível de significância de 5%. Para a enumeração de bactérias ácido-lácticas (UFC/mL) em meio ágar MRS (Difco), a análise estatística utilizada foi o teste de One-way ANOVA em nível de significância de 5%. Os resultados da avaliação sensorial foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados das análises microbiológicas dos leites fermentados utilizaram estatística descritiva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de antagonismo *in vitro* contra *E. coli* EHEC e EIEC

O teste de antagonismo *in vitro* obteve como médias e desvio padrão (σ) para os grupos compostos por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 contra *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) os resultados descritos na Figura 3. Os resultados demonstraram que todos *Lactobacillus* testados desenvolveram halos de inibição contra os micro-organismos patogênicos. *L. plantarum* B7 obteve valores de 55,59 mm frente a EHEC e de 57,86 mm contra EIEC. Os halos de *L. rhamnosus* D1 foram maiores que a outra BAL testada, para EHEC e EIEC, com valores de 67,46 mm e 91,01 mm, respectivamente. Sendo o maior halo encontrado o de *L. rhamnosus* D1 contra EIEC.

Costa et al. (2013) também avaliaram o antagonismo dessas bactérias ácido-láticas e encontraram para *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* no antagonismo contra *E. coli* ATCC 25922, respectivamente halos de 32,24 mm e 41,87 mm, sem diferenças estatisticamente significativas. Alguns pesquisadores também demonstraram a atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. contra *E. coli* e outras bactérias patogênicas (Garde et al., 2001; Caridi, 2002).

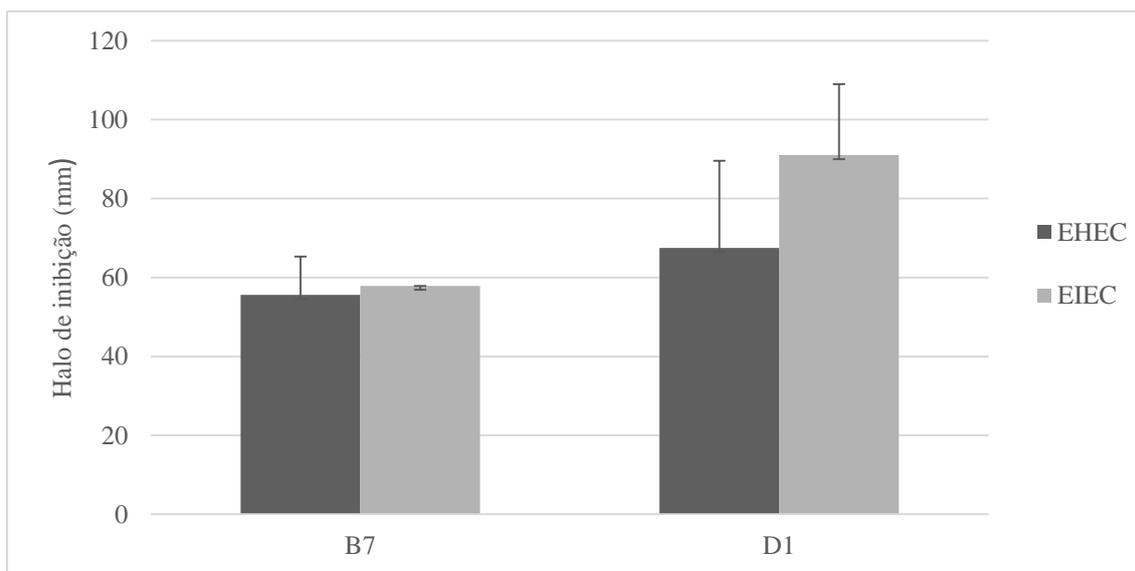


Figura 1. Médias dos halos de inibição (mm) e desvio padrão dos testes de antagonismo *in vitro* de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 contra *E. coli* EHEC e *E. coli* EIEC

No estudo de Chioda et al. (2007), todas as amostras de *Lactobacillus* mostraram-se capazes de inibir *E. coli* EHEC, com halos de inibição (medida do raio) variando de 12 a 15 mm, sendo que a maioria apresentou 14 mm, consideradas pelo autor como fortes halos de inibição. Ogawa et al. (2001) estudaram o efeito inibitório de *L. acidophilus* YIT 0070 sobre *E. coli* (EHEC) O157: H7 e relataram que a inibição do crescimento e a atividade bactericida de *L. acidophilus* ocorreram devido a produção de ácido lático e à diminuição do pH. Em pesquisa realizada por Guedes-Neto et al. (2005), *L. rhamnosus* foi uma das espécies que apresentou as

maiores médias dos halos de inibição frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, como na inibição de *E. coli*, com 69,77 mm no halo formado.

O ácido láctico é um dos fatores de inibição mais importantes no caso dos *Lactobacillus* avaliados nessa tese. Esse ácido causa efeito bacteriostático ou bactericida (Grajek et al., 2005). A produção de bacteriocinas também pode ser responsável pela inibição. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre a capacidade de inibição entre as amostras de BAL, apenas na susceptibilidade de cada reveladora. O que pode ser observado é um maior halo de inibição da EIEC por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 e em seguida da EHEC.

Porém as substâncias potencialmente inibidoras como os ácidos orgânicos (ácido láctico) e as bacteriocinas possuem pesos moleculares diferentes. Portanto, migram de forma distinta dentro do ágar, dificultando uma comparação dos diâmetros dos halos em termos numéricos. A relação é inversamente proporcional quanto ao tamanho das partículas formadas por cada substância, sendo a taxa de difusão dos halos facilitada por partículas de menor volume e dificultada com as de grande volume (Savino et al., 2011).

5.2. Teste de proteção *in vivo* contra *E. coli* EHEC e EIEC

5.2.1. Translocação em camundongos Balb/c

Os experimentos de translocação para baço e fígado em camundongos Balb/c inoculados diariamente com lactobacilos probióticos, desafiados no sétimo dia com EHEC ou EIEC e sacrificados no décimo quinto dia foram negativos, não apresentaram crescimento nas diluições testadas. Nesse caso, não pode ser vinculada a redução na infecção sistêmica pela administração oral de *L. plantarum* B7 ou de *L. rhamnosus* D1, pois também não houve crescimento nos controles. Porém pode-se considerar por meio desses resultados negativos de translocação, segurança na utilização oral dessas BAL. Esses achados são confirmados em alguns estudos semelhantes, que administraram oralmente *L. rhamnosus* HN001 (DR20E), *L. acidophilus* HN017 e *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10E), ou *Lactobacillus plantarum* 299v e também não encontraram incidência de translocação bacteriana, confirmando o uso seguro dessas bactérias potencialmente probióticas (Mangell et al., 2012; Zhou et al., 2000).

Já no estudo de Gill et al. (2001) demonstrou que o tratamento com cepas probióticas antes do desafio com enteropatógenos pode conferir uma excelente proteção contra translocação e infecção sistêmica. No caso do probiótico ser administrado após o desafio, o mesmo pode ter atuação contra os patógenos, porém a resposta obtida não deve ser tão eficaz quanto se o pré-tratamento houvesse sido realizado.

5.2.2. Análises histopatológicas

5.2.2.1. Exames histológicos dos rins, fígados e cólons

Foram examinados cortes histológicos de rim, fígado, cólon e íleo e documentados de acordo com as imagens obtidas na microscopia óptica. Os rins, fígado e cólons do grupo controle e de todos os grupos infectados (desafiados) apresentaram alterações histopatológicas pouco significativas e inespecíficas, tais como algum grau de edema da mucosa intestinal colônica, discretas alterações descamativas do epitélio de superfície nos cólons, e apenas alterações congestivas nos vasos dos rins e fígado (**Figura 4**). Os animais dos grupos tratados apenas com probióticos (B7 e D1) não apresentaram alterações.

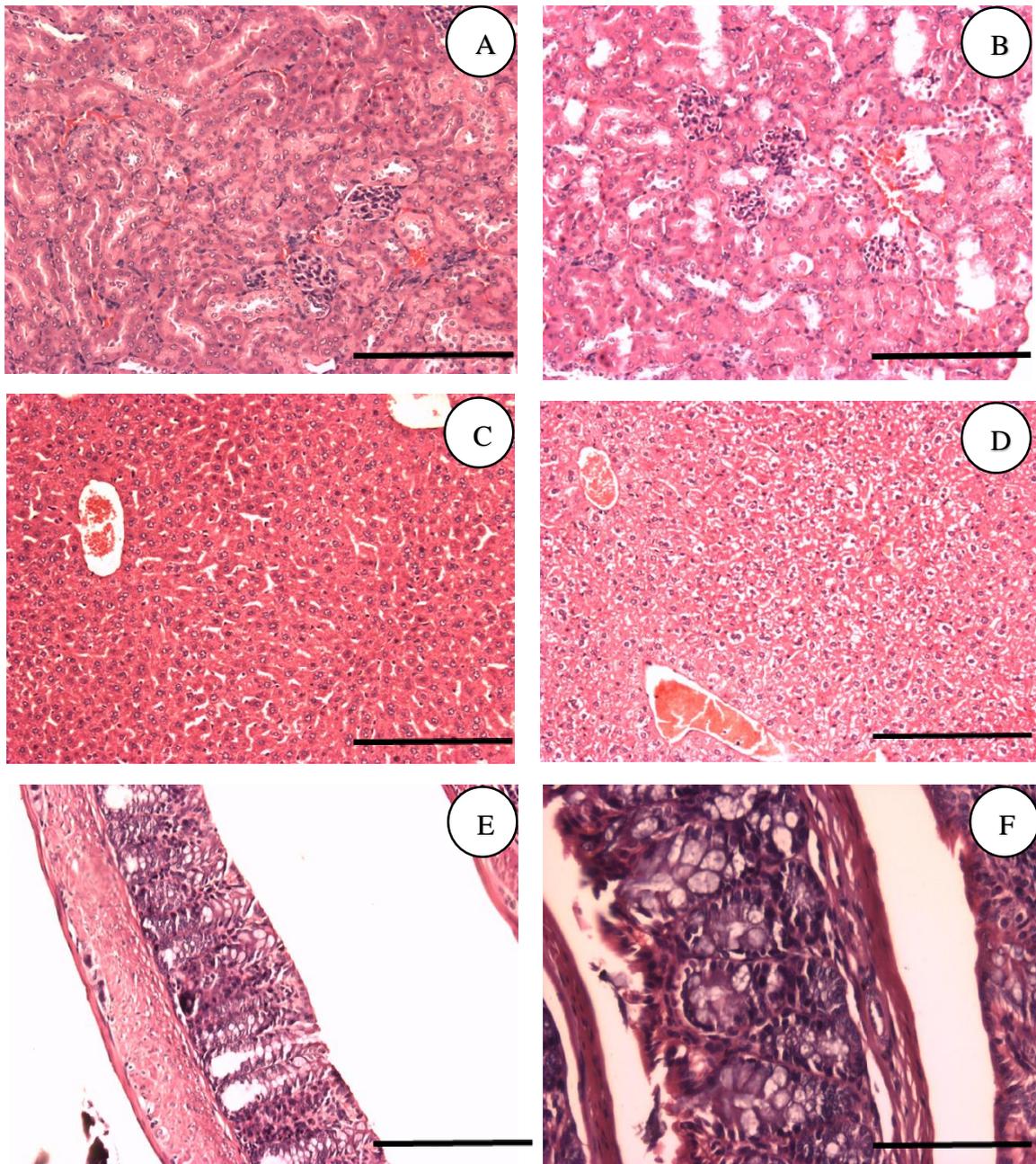


Figura 2. Aspectos histológicos dos rins e dos fígados dos grupos inoculados com EHEC e EIEC sem lesões dignas de nota (10X Barra: 100 μ m). (A) rim do grupo EHEC, (B) rim do grupo EIEC, (C) fígado do grupo EHEC, (D) fígado do grupo EIEC, (E) cólon do grupo EHEC, (F) cólon do grupo EIEC. Coloração com Hematoxilina-Eosina.

5.2.2.2. Exames histológicos dos íleos dos grupos inoculados com EHEC

As análises dos intestinos delgados (íleos) dos grupos infectados mostraram alterações que variaram entre os grupos e foram descritas e documentadas abaixo.

As lesões do grupo infectado com EHEC atingiram alguns animais do grupo enquanto outros estavam preservados. Houve discreta perda focal da arquitetura das vilosidades intestinais, com pequenas áreas de rebaixamento do epitélio, e evidências de necrose focal da submucosa e mucosa (**Figura 5A, B**).

Não houve grandes diferenças em relação ao grupo desafiado com EHEC e tratado com probiótico, sendo que não houve elementos para sugerir proteção por *L. plantarum* B7 no tempo de tratamento. As lesões foram raras, focais, atingindo a camada mucosa e submucosa, geralmente associadas à presença de congestão venosa dos vasos da camada submucosa. Houve focos de rebaixamento da altura e perda focal da arquitetura das vilosidades e alguns pequenos focos de ulceração superficial associados à necrose coagulativa, sem presença de fibrina, células inflamatórias ou outras alterações regenerativas do epitélio (**Figura 5C**).

As lesões do grupo desafiado com EHEC e tratadas com *L. rhamnosus* D1 foram irregulares, infrequentes, apresentando um quadro discretamente melhor do que o grupo desafiado apenas com EHEC (**Figura 5D**).

Portanto, a apresentação focal e esporádica das lesões e os quadros semelhantes tornaram mais difíceis as análises comparativas do grupo EHEC, com os grupos desafiados e tratados com os probióticos.

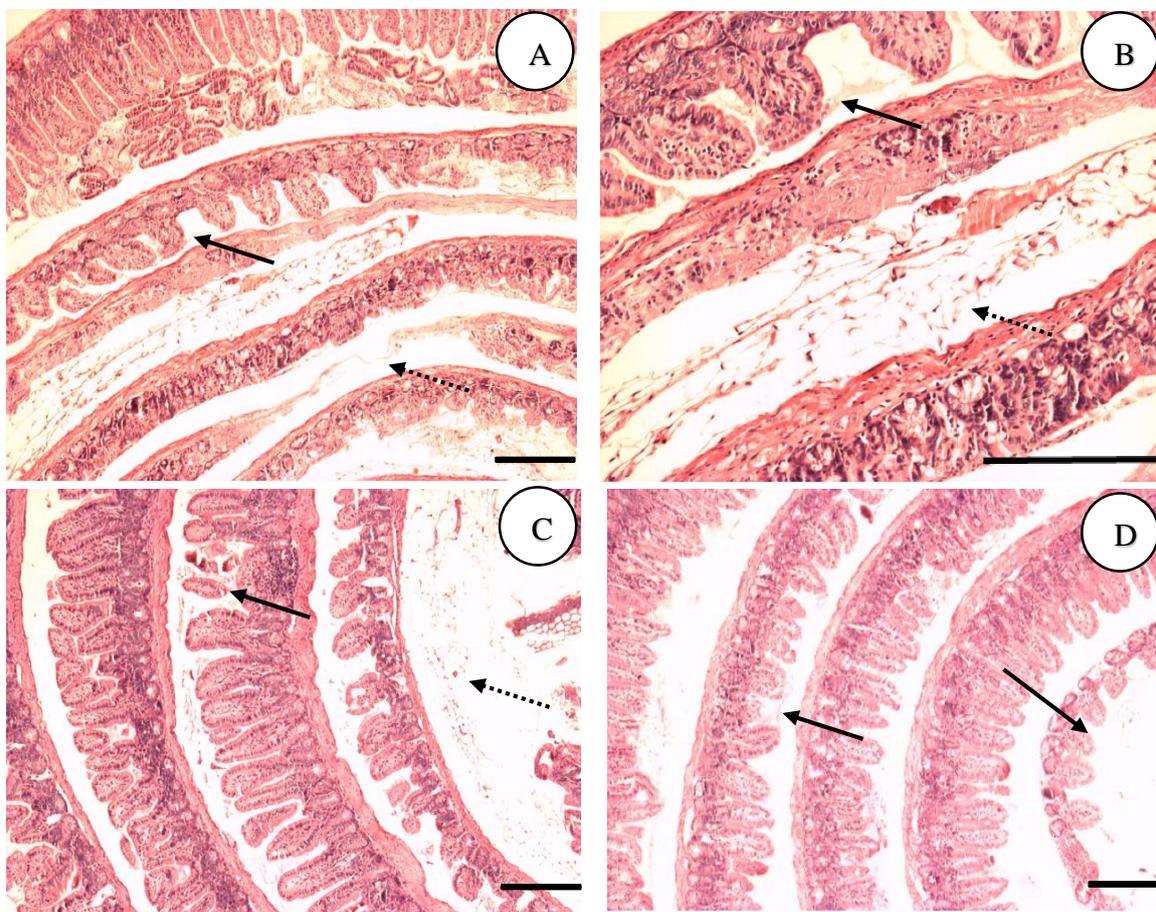


Figura 3. Aspectos histológicos dos íleos dos grupos infectados com EHEC (A) e (B) grupo EHEC (4X Barra: 100 μ m) e (10 X Barra: 100 μ m), respectivamente, (C) grupo desafiado *L. plantarum* x EHEC (4X), (D) grupo desafiado *L. rhamnosus* x EHEC (4X). Setas contínuas: lesões com perda focal da arquitetura das vilosidades intestinais. Setas tracejadas: necrose focal da submucosa e mucosa. Coloração com Hematoxilina-Eosina.

Shu e Gill (2002) investigaram os efeitos de proteção de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com *L. rhamnosus* HN001, durante 7 dias e desafiados contra *E. coli* O157:H7 por mais 7 dias. Ao contrário dos resultados encontrados nessa tese, o estudo anterior relatou que camundongos tratados com o probiótico *L. rhamnosus* HN001 podem reduzir o grau de gravidade da infecção por *E. coli* O157:H7, além de aumentar as respostas da imunidade humoral e celular. Já Mirzaei et al. (2012) utilizaram o *L. plantarum* e o *L. casei*, que foram isolados de queijo Ligvan, no desafio contra *E. coli* O157: H7 e também obtiveram efeitos inibitórios na infecção por essa bactéria. No trabalho desenvolvido por Namjoo et al. (2012), os camundongos infectados após o dia 7 com EHEC e tratados durante 14 dias com *Bifidobacterium angulatum* apresentaram menor duração e redução na severidade da doença ocasionada. Ogawa et al. (2001) não encontraram lesões histopatológicas notáveis no grupo tratado com *L. casei* contra *E. coli*

O157:H7, exceto pelo aumento na atividade mitótica no cécum e a leve esfoliação no epitélio do cólon, ao contrário das lesões de necrose no topo das vilosidades e a crescente invasão e crescimento de EHEC no jejuno e íleo; assim como vacúolos e esfoliação nas células epiteliais, infiltrações pseudo-eosinofílicas e atividade mitótica no ceco; e esfoliação e necrose no cólon.

Porém, de acordo com Karpman et al. (1997) e Conlan e Perry (1998) os camundongos convencionais Balb/c demonstraram uma relativa resistência à infecção com *E. coli* O157:H7. Eles conseguiram uma diminuição no número dessas bactérias a uma curta duração, comparado a outras espécies de camundongos e produziram mais níveis séricos de IgA específico contra o antígeno O157 nas respostas de infecções primárias e secundárias, ao contrário dos baixos níveis encontrados em camundongos da espécie C57BL/6. A idade dos camundongos BALB/c desafiados com essa bactéria também foi avaliada por Brando et al. (2008), que constataram que apenas os camundongos com idade inferior a 21 dias apresentaram manifestações sistemáticas da doença, assim como lesões histopatológicas. Portanto, a idade desses animais pode ser um importante fator na suscetibilidade frente a EHEC. Como no atual trabalho foi utilizado essa raça de camundongos BALB/c e com idades superiores a 21 dias, pode-se ter uma explicação pelas lesões raras e sem diferenças significativas encontradas nos animais infectados por *E. coli* O157:H7.

5.2.2.3. Exames histológicos dos íleos dos grupos inoculados com EIEC

As lesões ileais do grupo inoculado com EIEC foram focais, atingindo as camadas mucosa e submucosa, geralmente associadas à presença de congestão venosa dos vasos da camada submucosa. Houve focos de rebaixamento da altura e perda focal da arquitetura das vilosidades e alguns pequenos focos de ulceração superficial associados a necrose coagulativa sem presença de fibrina, células inflamatórias, ou outras alterações regenerativas do epitélio. Em comparação com o desafio dos grupos infectados com EHEC, este grupo apresentou lesões mais bem definidas e frequentes e se prestou melhor para comparações com os grupos tratados pelos probióticos (**Figura 6 A, B**).

A maior parte dos animais desse grupo tratados com *L. plantarum* B7 e desafiados com EIEC protegeu a mucosa, que apresentou discreta extensão da mucosa baixa, e apenas edema de vilosidades que estavam altas e com epitélio íntegro. Há elementos para sugerir proteção nesses casos (**Figura 6 C**).

Os animais do grupo tratado com *L. rhamnosus* D1 e que foram inoculados com EIEC, apresentaram íleo preservado na maioria deles (**Figura 6 D**). Houve preservação da maior parte dos íleos examinados, que apresentaram apenas discretos focos de congestão da submucosa e edema associado. Em apenas um dos animais do grupo houve uma área lesada em pequena intensidade (apenas vilosidades mais baixas e edematosas). Nos demais casos, não houve áreas de lesão significativas, sugerindo uma grande proteção por *L. rhamnosus* D1.

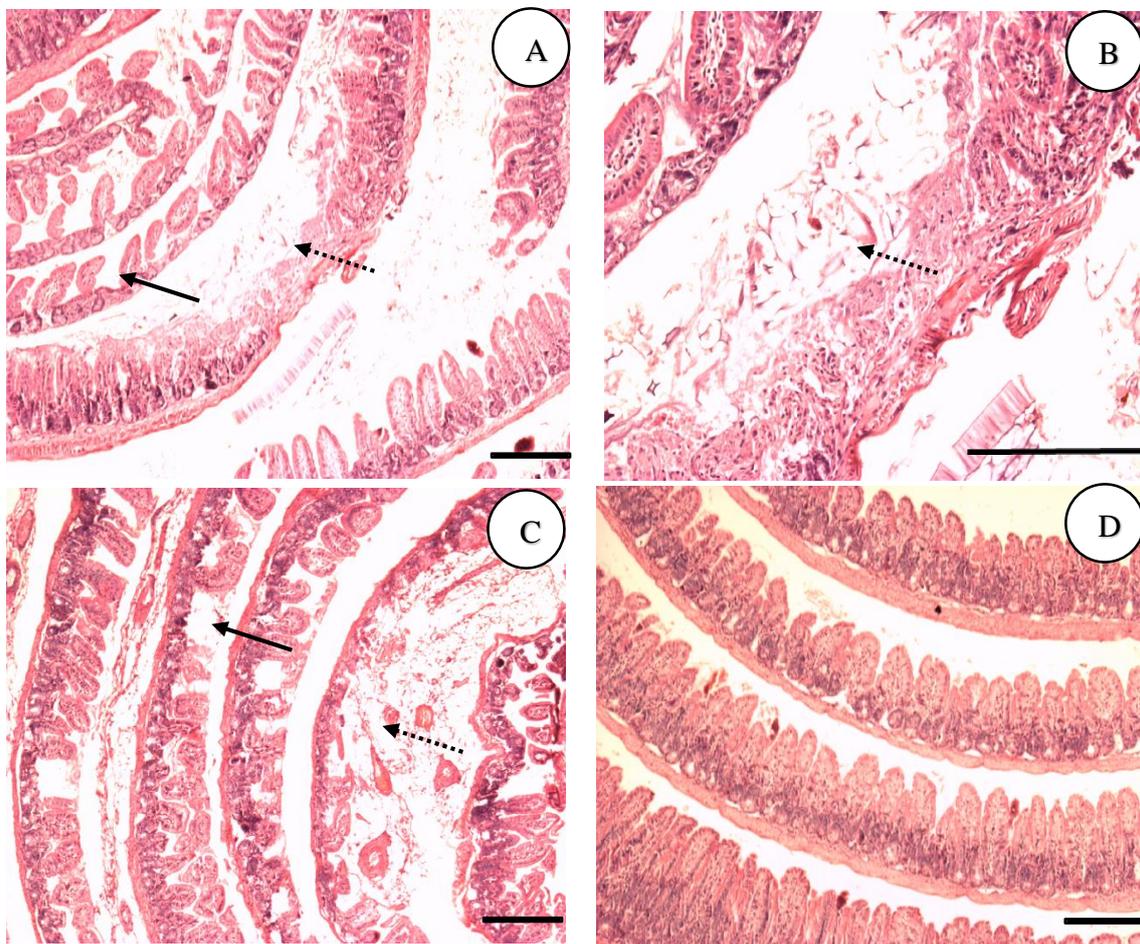


Figura 4. Aspectos histológicos dos íleos dos grupos infectados com EIEC (A) e (B) (4X Barra: 100 μ m) e (10 X Barra: 100 μ m), respectivamente, (C) grupo desafiado *L. plantarum* x EIEC (4X), (D) grupo desafiado *L. rhamnosus* x EIEC (4X). Setas contínuas: lesões com perda focal da arquitetura das vilosidades intestinais. Setas tracejadas: necrose focal da submucosa e mucosa. Coloração com Hematoxilina-Eosina.

Medici et al. (2005) investigaram a capacidade de proteção na administração oral de algumas espécies probióticas como *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. termophilus* contra *E. coli* EIEC em camundongos BALB/c e encontraram um aumento na porcentagem de fagocitoses e no número de células IgA no jejuno e íleo, assim como uma diminuição na colonização do fígado e baço pelas bactérias e um aumento na secreção de IgA anti-*E. coli* nos fluidos intestinais, em comparação ao grupo controle. Na histopatologia, foi encontrado nos animais infectados nos dias 5 e 7 um moderado infiltrado de linfócitos e monócitos, em comparação aos animais do grupo controle. Não foram encontradas mudanças morfológicas significativas, como a presença de edema ou atrofia na mucosa no intestino, o que diverge dos resultados na presente tese, como lesões focais, com presença de congestão venosa, perda focal da arquitetura das vilosidades e pequenos focos de ulceração e necrose, entre outros.

No experimento realizado com linhagens de células epiteliais intestinais humanas (HT29/cl.19^a e Caco-2) e expostas a *E. coli* (EIEC 029:NM) e bactérias probióticas, como *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, houve resultados de proteção, por meio de mecanismos de interferência na invasão e adesão dos patógenos testados (Resta Lenert e Barret, 2003). Esses mecanismos podem ser parte da explicação da proteção fornecida por *L. rhamnosus* D1 contra EIEC do trabalho atual, que podem ser comprovados por meio da realização de futuros experimentos na área.

A curva de sobrevivência não foi realizada nesse trabalho, pois as bactérias patogênicas utilizadas, que são *E. coli* EHEC e *E. coli* EIEC apenas causam na maioria dos casos morbidade em camundongos Balb/c, como foi discutido por Karpman et al. (1997), Conlan e Perry (1998). Além desses camundongos terem a idade acima de 21 dias, que também os tornam mais resistentes as manifestações sistemáticas da doença (Brando et al., 2008).

5.3. Avaliação do leite de búfala *in natura*

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas do leite de búfala utilizado na fabricação de três lotes de leites fermentados, encontram-se na Tabela 2. Os valores observados apresentaram-se dentro da normalidade esperada para todos os parâmetros do leite bubalino (Verruma e Salgado, 1994; Nader-Filho et al., 1996; Vianni et al., 2000; Amaral, 2005a), para a fabricação de um leite fermentado de boa qualidade.

A Federação Internacional de Laticínios (FIL-IDF) estabeleceu para leite obtido em condições higiênicas insatisfatórias uma contagem total superior a 10^5 UFC/mL, portanto, como os resultados desta pesquisa foram inferiores a esse valor (média de $3,0 \times 10^4$), pode-se dizer que a higiene foi adequada durante a ordenha e após a coleta (Ordoñez et al., 2005).

De acordo com pesquisadores, os padrões baseados na CCS do leite de vacas não podem ser comparados ao leite de búfalas, pois a tendência do leite bubalino é apresentar menores valores de CCS. Essa maior resistência à mastite da glândula mamária bubalina em relação à bovina se deve aos aspectos anatômicos e fisiológicos, como uma maior concentração de neutrófilos no leite e a presença de um maior teor de lactoferrina, que possui atividade antibacteriana. (Silva e Silva, 1994; Amaral, 2005a; Araújo e Gheller, 2005).

Tabela 2. Parâmetros do leite de búfala resfriado na coleta de três ordenhas

Amostra	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)	CCS ¹ (x1000/mL)	CBT ² (x1000 UFC/mL)
1	7,05	3,67	4,95	16,71	37	$1,5 \times 10^4$
2	7,195	3,73	4,79	17,78	32	$1,7 \times 10^4$
3	7,32	3,73	4,84	16,94	33	$5,8 \times 10^4$
Média*	7,18±0,13	3,71±0,03	4,86±0,08	17,14±0,56	34±2,75	$3,0 \pm 2,42 \times 10^4$

* média ± desvio padrão; ¹CCS = Contagem de Células Somáticas; ²CBT = Contagem Bacteriana Total

5.3.1. Teste de inibidores de crescimento microbiano

Após a adição e crescimento da cultura para iogurte e adição do reagente TTC, as amostras adquiriram coloração rósea, indicando presença de crescimento bacteriano, ou seja, ausência de inibidores no leite. Essas amostras de leite de três diferentes ordenhas de leite de búfala foram então consideradas adequadas para o preparo dos leites fermentados deste experimento, pois não apresentaram inibidores para o desenvolvimento e crescimento das culturas de bactérias ácido lácticas utilizadas.

5.3.2. Curvas de Fermentação / Crescimento

5.3.2.1. pH

Os resultados de pH das curvas de fermentação obtidos são apresentados na **Figura 7** (valores médios no **Anexo VI**), permitindo avaliar essa variável durante a incubação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ dos leites de búfala esterilizados, adicionados de *L. plantarum* B7 ou *L. rhamnosus* D1. O término da fermentação foi considerado baseando-se na observação da formação do coágulo, especificamente no desprendimento do coágulo da parede do frasco e na determinação do pH entre 4,5 e 5. Ocorreria retração do coágulo e dessoragem caso o leite fermentado permanecesse por mais tempo incubado, o que levaria a interferência nos parâmetros físico-químicos, como pH e acidez titulável e também na aceitação dos produtos durante as análises sensoriais. A redução acentuada de pH comprometeria também a viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento desses produtos sob refrigeração, uma vez que o pH baixo ao fim da fermentação resulta em maior queda de pH durante o período de estocagem sob refrigeração (Donkor et al., 2006).

De acordo com as análises das variações de pH durante o tempo inicial- 0 horas a 26 horas de fermentação dos leites de búfala não foram observadas diferenças entre as médias dos tratamentos ($p > 0,05$). Os leites fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 apresentaram pH inicial igual a 6,47 e 6,50 e pH final também semelhantes (4,97 e 4,88, respectivamente) ($p > 0,05$). Os valores encontrados foram satisfatórios, pois o pH final deve estar entre 4,5 e 5,0, podendo chegar a 4,0 durante a vida-de-prateleira do produto, sem prejudicar a viabilidade das bactérias probióticas (Lee e Salminen, 1995).

Os produtos elaborados apresentaram queda do pH semelhante ao longo da fermentação, que pode ser constatada pela semelhança entre as curvas de fermentação no gráfico da **Figura 7**. No trabalho de Viegas (2008) também ocorreu a mesma tendência de queda do pH ao longo da fermentação por outras BAL utilizadas.

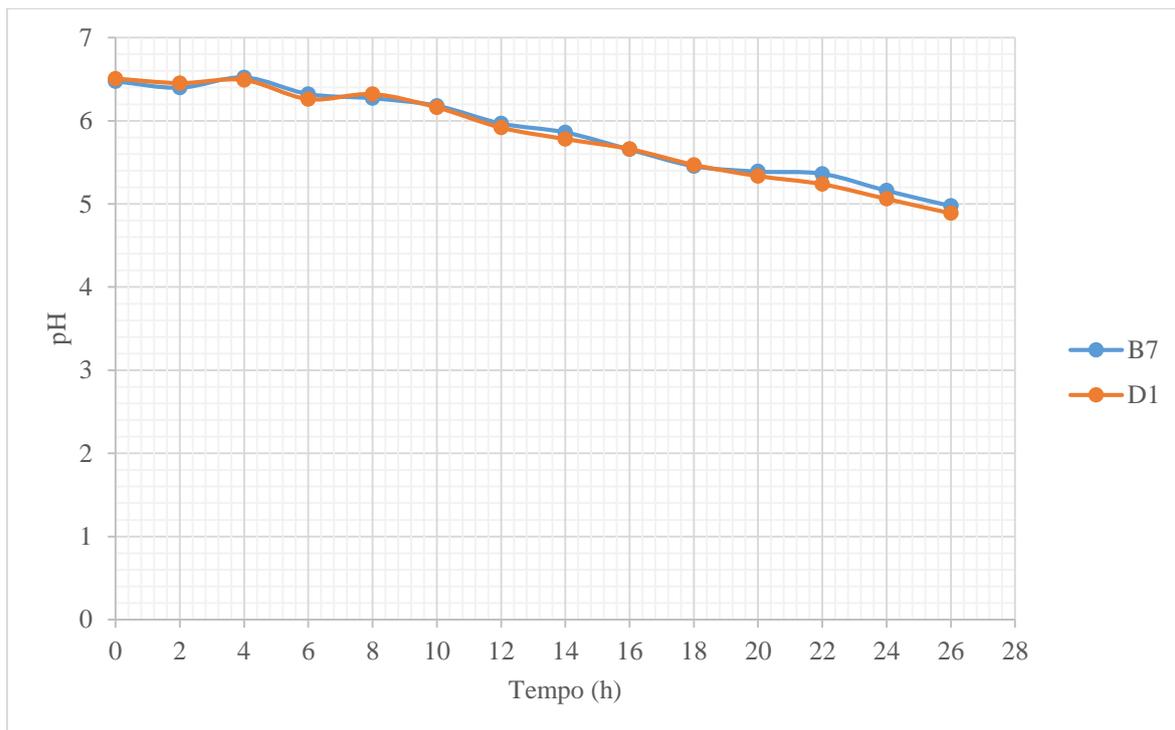


Figura 5. Médias de pH durante a fermentação de leites de búfala em 3 repetições, nos tempos de fermentação (0-26 horas), por *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1)

5.3.2.2. Enumeração das bactérias- ácido-láticas

Os valores apresentados na **Figura 8** (valores numéricos no **Anexo VI**) retratam o crescimento e a viabilidade das culturas *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 durante a fermentação de leites de búfala esterilizados. A contagem média dos lactobacilos em cada leite fermentado ($3,9 \times 10^7$ para o D1 e $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para o B7), no período de 26 horas de fermentação foram superiores ao mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados – 10^6 UFC/mL (Brasil, 2007). Para garantir que contagens adequadas de lactobacilos sejam mantidas nos produtos fermentados, estocados sob refrigeração, durante todo o período de validade são desejáveis contagens mais elevadas de micro-organismos probióticos nos produtos finais, para que alcancem o trato gastrointestinal e desenvolvam efeitos benéficos ao consumidor.

As médias das contagens totais de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 apresentaram depois das doze primeiras horas, algumas quedas ou altas na enumeração de lactobacilos, com contagens variando de 10^7 UFC/mL e alcançando 10^8 UFC/mL, que é esperado durante o crescimento dessas BAL.

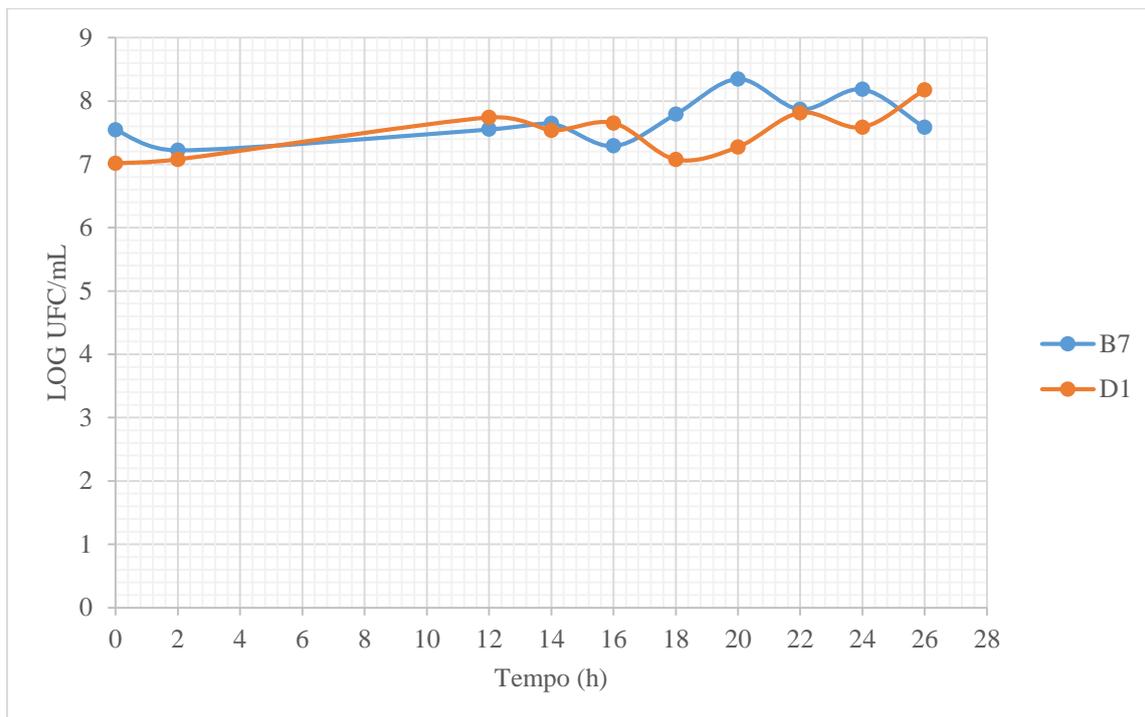


Figura 6. Médias de lactobacilos em três repetições das contagens (log UFC/mL) durante a fermentação de leite de búfala esterilizado, nos tempos de fermentação (0-26 horas), por *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1)

5.4. Avaliação físico-química dos leites fermentados durante o armazenamento

5.4.1. pH

O **Anexo VII** apresenta os valores de pH nos tempos 1, 14 e 28 dias de armazenamento de leites fermentados de búfala elaborados com as culturas *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, a 4-7°C.

Como pode ser observado na **Figura 9**, as variações de pH encontradas entre os leites fermentados elaborados não foram diferentes ($p > 0,05$) durante os 28 dias de estocagem sob refrigeração a 4-7°C. Donkor et al. (2006) também não observaram diferença na diminuição do pH entre diferentes iogurtes adicionados de culturas probióticas, como *L. acidophilus* e *L. paracasei* durante 28 dias e, segundo os referidos autores, as variações de pH observadas ($p > 0,05$), provavelmente, não foram capazes de interferir na viabilidade das culturas probióticas utilizadas. Porém, observando-se o **Anexo VII**, a diminuição de pH, com diferença estatística, foi observada entre os dias de estocagem (1, 14 e 28) dos leites fermentados produzidos neste experimento ($p < 0,05$).

Com relação ao pH do iogurte, que possui culturas diferentes do leite fermentado, produzido com leite de búfala integral, trabalhos anteriores apontam valores entre 4,03 (Scholz e Antunes, 1996) e 4,74 (Yabu et al., 1988) após cerca de 15 dias de armazenamento a 7°C.

Os resultados de pH não podem ser comparados com base no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), pois esse parâmetro físico-químico não é abordado nessa legislação.

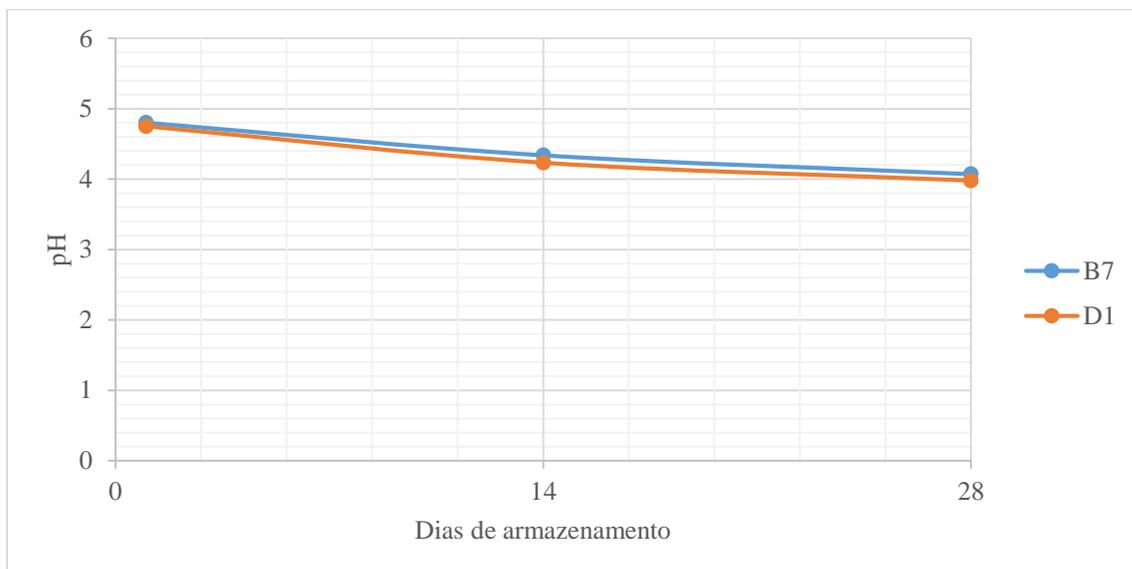


Figura 7. Médias de pH durante a fermentação do leite de búfala, em três repetições, nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento, armazenados a 4-7 °C e fermentados por *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1)

Faria et al. (2006a), mesmo utilizando leite de búfala desnatado, também obtiveram resultados parecidos em relação ao pH no primeiro dia de análise, com valores em torno de 4,86, para a inoculação com *L. casei* em leite de búfala. Porém, a fermentação ocorreu em 24 horas, ao contrário das 26 horas obtidas na atual pesquisa. Essa diferença no tempo de fermentação pode ocorrer de acordo com a ação de cada bactéria láctica utilizada como inóculo.

5.4.2. Teor de proteína

A **Tabela 3** apresenta os teores de proteína nos tempos 1, 14 e 28 dias de armazenamento a 4-7°C de leites fermentados de búfala elaborados com as culturas *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1.

Os resultados percentuais dos teores de proteína dos leites fermentados analisados não apresentaram interação significativa com os tempos (dias) de estocagem sob refrigeração a 4-7 °C ($p > 0,05$). Portanto, mesmo após os 28 dias de armazenamento o teor proteico se manteve constante, indicando um produto de boa qualidade. Resultados parecidos foram encontrados no iogurte de búfala produzido por Cunha Neto et al. (2005), que também não encontraram variações do teor proteico inicial. Faria et al. (2006a) obtiveram para o leite de búfala fermentado com *Lactobacillus casei* teor semelhante de proteína, com 3,63%, assim como os valores próximos nos trabalhos de Barbosa et al. (2002), de 3,79%; Cunha Neto et al. (2005), de 4,68%.

Com base no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), as médias dos produtos apresentados na **Tabela 3** indicam que todos atenderam ao requisito mínimo estabelecido para produtos de leite de vaca, que é igual a 2,9% de proteína.

Tabela 3. Médias dos teores de proteína, de três repetições de leites de búfala fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, durante os dias 1, 14 e 28 de estocagem sob refrigeração a 4-7°C

Tempos (dias)	Proteína (%)	
	B7	D1
1	3,60Aa	3,68Aa
14	3,64Aa	3,73Aa
28	3,63Aa	3,65Aa
Média	3,62	3,68
Desvio-padrão	0,020	0,040

5.4.3. Teor de gordura

A **Tabela 4** apresenta os teores de gordura nos tempos 1, 14 e 28 dias de armazenamento a 4-7°C de leites fermentados de búfala elaborados com as culturas *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1.

Os resultados percentuais dos teores de gordura dos leites fermentados analisados não apresentaram interação significativa com os tempos (dias) de estocagem sob refrigeração a 4-7°C ($p > 0,05$). Portanto, mesmo após os 28 dias de armazenamento a porcentagem de gordura se manteve constante, não ocorrendo degradação da mesma, indicando um produto de boa qualidade.

Os teores de gordura, encontrados nos leites fermentados de búfala, foram similares aos relatados por Rocha et al. (2008) de 6,0%; Cunha Neto et al. (2005) com 6,80% e Borges et al. (2009) com 5,33%.

Tabela 4. Médias dos teores de gordura, de três repetições de leites de búfala fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, durante os dias 1, 14 e 28 de estocagem sob refrigeração a 4-7°C

Tempos (dias)	Gordura (%)	
	B7	D1
1	6,0Aa	5,7Aa
14	6,2Aa	5,6Aa
28	5,9Aa	5,2Aa
Média	6,03	5,50
Desvio-padrão	0,152	0,264

5.5. Avaliação microbiológica dos leites fermentados

5.5.1. Enumeração de bactérias ácido-láticas

A **Figura 10** (valores numéricos no **Anexo VII**) apresentam as contagens totais das bactérias ácido-láticas (Log_{10} UFC/mL), nos tempos 1, 13 e 27 dias de armazenamento de leites fermentados de búfala elaborados com as culturas *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, a 4-7°C.

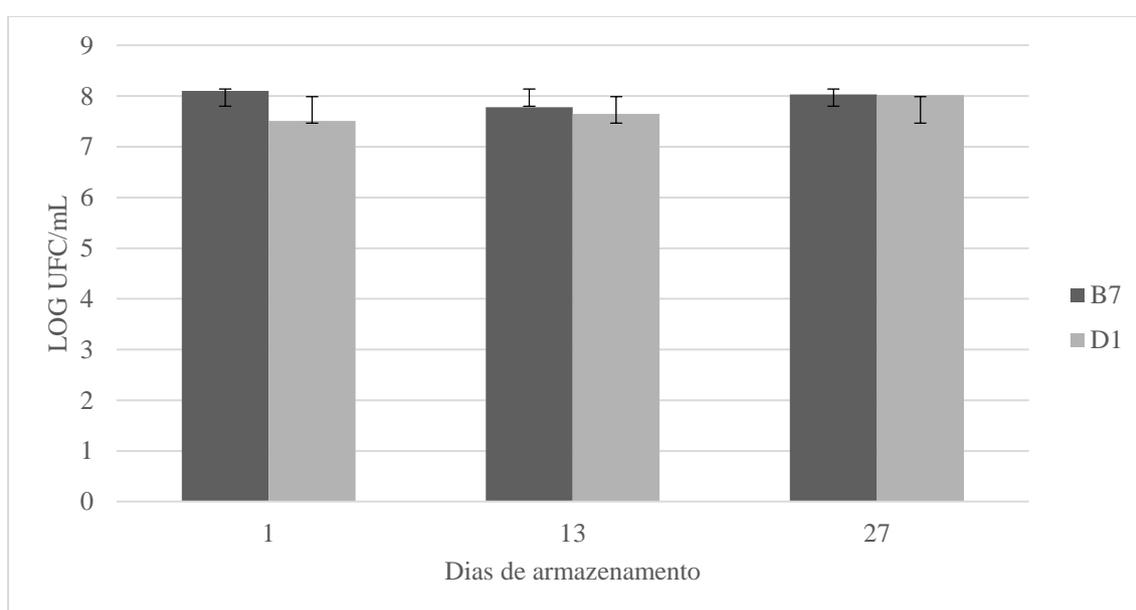


Figura 8. Médias das contagens de bactérias ácido láticas (Log_{10} UFC/mL) em ágar MRS no leite de búfala fermentado, em três repetições, nos dias 1, 13 e 27 de armazenamento, por *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1) e armazenados a 4-7 °C

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os valores médios de três repetições das contagens (Log_{10} UFC/g) das bactérias lácticas totais presentes nos dois leites fermentados e nos valores médios dessas contagens durante cada um dos três tempos (dias) diferentes de estocagem sob refrigeração a 4-7°C (**Figura 10**).

O pH de fermentação foi suficiente para garantir a inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, pois esse pH deve estar na faixa de 4,5 e 5, correlacionando-o com a acidez para o leite fermentado (Brasil, 2000), como foi encontrado na tese em questão, com valores de pH entre 3,98 e 4,8 entre os dias 1, 14 e 28 de armazenamento.

A legislação brasileira estabelece requisitos mínimos de contagens de micro-organismos específicos de 10^6 nos leites fermentados, que devem ser cumpridos durante todo o prazo de validade desses produtos (Brasil, 2007). A adequação ao padrão pode ser verificada nos resultados, durante os 28 dias de estocagem sob refrigeração, pois os produtos fermentados (B7 e

D1) apresentaram contagens entre 10^7 e 10^8 UFC/g. Portanto, os níveis populacionais das bactérias no leite fermentado não foram prejudicados pelo armazenamento sob refrigeração e/ou pela acidificação do produto, demonstrando um aspecto tecnológico positivo das bactérias ácido-láticas testadas.

Em alimentos probióticos é necessário que as bactérias lácticas possam ser cultivadas em escala industrial, com o produto final possuindo vida média variando de 15 a 30 dias, micro-organismos viáveis e em número adequado ($>10^6$ UFC/g) e propriedades sensoriais, como cor, aroma, sabor e textura aceitáveis durante a vida-de-prateleira (Brasil, 2000; Trabulsi e Sampaio, 2000).

De acordo com Gomes e Malcata (1999), para se obter a dose diária mínima recomendada pelo consumo de 100 g do produto (10^6 – 10^7) no trato gastrointestinal, é necessário o número elevado de 10^8 a 10^9 micro-organismos viáveis no produto final. Para manter o efeito dos micro-organismos na composição da microbiota intestinal, que possuem colonização temporária, estes produtos devem ser consumidos regularmente.

Na pesquisa de Faria et al. (2006a) em leite fermentado produzido com leite de búfala, o número inicial médio de log UFC/mL para *L. casei* foi 11,00 e o final variou entre 10,08 para o produto estocado a 5°C e 9,63 para a estocagem a 10°C. A viabilidade média de *B. longum* foi 10,46 log UFC/mL no tempo inicial, variando entre 9,92 e 9,60 log UFC/mL no tempo final para o produto estocado a 5 e 10°C, respectivamente.

5.5.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Na pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, em todos os leites fermentados, não foi observada presença de gás em nenhum dos tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio e tubos de Durhan invertidos. Por isso, somente a Prova Presuntiva foi realizada durante essa análise. Esses resultados indicam qualidade microbiológica superior à exigida no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), com um processo de produção e armazenamento dos leites fermentados produzidos, com boa qualidade higiênico-sanitária e não causando interferências no produto final.

5.5.3. Pesquisa de bolores e leveduras

Não foi observado o crescimento de colônias de bolores e leveduras nas placas incubadas com as amostras dos leites fermentados. Os resultados indicaram ausência de bolores e leveduras em todos os leites fermentados armazenados durante os 28 dias sob refrigeração a 4-7°C. Esse resultado comparado com o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), que permite até duas amostras entre cinco com contagens entre 50 a 200 UFC/g, indica uma qualidade superior à exigida. E também demonstram que não houve contaminação ambiental ou por manipulação por bolores e leveduras.

5.5.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Os resultados dos leites fermentados durante o período de armazenamento apresentaram ausência de *Salmonella* spp., estando as amostras de acordo com os padrões estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n°. 12 (BRASIL, 2001). Esses resultados são semelhantes aos relatados por Queiroz et al. (2002).

5.5.5. Pesquisa de *Staphylococcus* spp.

Não existem na RDC n°. 12 (Brasil, 2001) e no RTIQ (Brasil, 2007) padrões para contagem de *Staphylococcus* spp., mas o resultado negativo demonstra a segurança e a qualidade na produção e manipulação dos leites fermentados produzidos com leite de búfala e armazenados durante 28 dias, sob refrigeração a 4-7°C.

5.6. Análise Sensorial

5.6.1. Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos e intenção de compra

As medianas apresentadas na **Tabela 5** referem-se aos resultados da análise sensorial dos leites fermentados de búfala por *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1) a cada grau de aceitação (gostei muito a desgostei muito), representados em forma de pontos atribuídos presentes na escala hedônica de cinco pontos (1-5) da ficha sensorial.

Tabela 5. Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites de búfala esterilizados, fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 armazenados por 14 e 28 dias, sob refrigeração 4-7°C

Leites fermentados	Dias de armazenamento	
	14	28
B7	4Aa	4Aa
D1	4Aa	4Aa

Letras minúsculas iguais na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna não indicam diferença estatística significativa ($p>0,05$) segundo teste de Kruskal Wallis

1- Desgostei muito, 2- Não gostei, 3- Não gostei nem desgostei, 4- Gostei, 5- Gostei muito

B7: leite fermentado por *Lactobacillus plantarum*; D1: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*

Os resultados da análise sensorial dos leites fermentados armazenados por 14 e 28 dias sob refrigeração a 4-7°C indicaram uma igualdade de preferência pelos leites fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, que apresentaram uma mediana (4) correspondente ao grau de aceitação “gostei”.

Os leites fermentados, com relação ao aspecto sensorial, não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre os dois tempos de estocagem avaliados (14 e 28 dias), sugerindo que o período de 28 dias pode ser utilizado como tempo de validade para esses produtos, pois esse período de estocagem sob refrigeração a 4-7°C não alterou as características sensoriais dos produtos avaliados.

Os comentários das fichas de análise dos leites fermentados estavam divididos em provadores que indicaram tanto o leite fermentado com *L. plantarum* B7, como o *L. rhamnosus* D1 como o mais ácido. Além disso, como o leite fermentado foi produzido com leite de búfala integral, algumas pessoas escreveram sobre o excesso de gordura em relação a outros leites fermentados e o aspecto ruim em relação a essa textura na boca, o que pode ser contornado com a padronização dessa gordura. Alguns trabalhos que abordaram a avaliação sensorial de iogurte produzido com leite de búfala também indicaram uma menor aceitação desses produtos em

relação aos produtos produzidos com leite integral bovino (Yabu et al., 1988; Queiroz et al., 2002, Cunha Neto et al., 2005). Porém, Chawla e Balachandran (1994) demonstraram que o iogurte de leite de búfala padronizado contendo 3,0% de gordura apresentou um desempenho melhor na avaliação sensorial realizada por provadores treinados.

No trabalho de Faria et al. (2006a), o resultado dos leites fermentados de búfala com *L. casei* e *B. longum* também tiveram uma boa aceitação, a média variou de 6,68 a 6,98, que correspondem às classificações “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, sendo que a escala hedônica utilizada foi a de 9 pontos. Neres et al. (2014) utilizaram no leite fermentado de búfala, cultura láctica probiótica mista de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. e também encontraram uma boa aceitação na maioria das notas, para todos os critérios, como cor, aroma, sabor e aceitação global, com valores entre 7 e 9 (respectivamente, gostei regularmente e gostei extremamente). Os iogurtes de leite de búfala desenvolvidos na pesquisa de Santa Rosa (2011) também tiveram um bom resultado nas médias das notas no teste de aceitação, usando a escala hedônica de 9 pontos, variando de 5,8 a 7,7, com o intervalo entre as classificações de gostei ligeiramente e gostei muito.

O resultado da análise da intenção de compra dos leites de búfala fermentados com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 corroborou com a aceitabilidade dos produtos. O leite fermentado D1 teve 63,28% e o B7 teve 61,31% de intenção de compra nos dois dias de armazenamento (**Tabela 6**). Neres et al. (2014) encontraram na intenção de compra do leite de búfala fermentado, sabor acerola, que 71% dos provadores comprariam o derivado, 24% talvez comprassem e 6% não comprariam. Resultados semelhantes de intenção de compra foram relatados por Borges et al. (2009) e Santa Rosa (2011). Com esses resultados de boa aceitação e intenção de compra dos leites fermentados de búfala e como não há no mercado a venda desse tipo de leite fermentado, seria interessante a produção desse derivado lácteo em escala industrial, visto que o leite de búfala possui qualidades tecnológicas e nutricionais superiores ao leite de vaca. Como na presente tese não foram utilizados adjuvantes na tecnologia de produção do leite fermentado e ainda assim o mesmo obteve boa aprovação por parte dos provadores, a sugestão de padronizar a gordura do leite de búfala, adicionar sabores de frutas e outros tipos de ingredientes levaria o produto a ter uma demanda de mercado compatível e com maiores chances de competir com similares produzidos com outros tipos de leite.

Tabela 6. Análise da intenção de compra dos leites fermentados de búfala com *L. plantarum* B7 ou *L. rhamnosus* D1, nos dias 14 e 28 de armazenamento sob refrigeração a 4-7°C

Leites fermentados	Dias			
	14	28	Média	Desvio-padrão
<i>L. plantarum</i> B7	60,13 %	62,50 %	61,31 %	0,016
<i>L. rhamnosus</i> D1	63,40 %	63,16 %	63,28 %	0,001

6. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

As amostras de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra apresentaram os seguintes resultados:

As duas BAL testadas foram capazes de produzir halo de inibição frente aos microorganismos patogênicos nos testes *in vitro*, com maior inibição da EIEC por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, em seguida pela EHEC, indicando uma boa capacidade probiótica.

Nos testes *in vivo*, os animais do grupo tratado com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 e que foram inoculados com EIEC obtiveram melhores resultados na preservação do óleo. Sugere-se a utilização do *L. rhamnosus* D1 contra a infecção por EIEC, pois mantiveram óleo preservado na maioria deles, apresentando o melhor resultado de proteção.

Os leites de búfala fermentados por *L. plantarum* e *L. rhamnosus* apresentaram acidificações similares ($p < 0,05$), e a diminuição do pH entre os dias de estocagem (1,14 e 28) não interferiram na viabilidade das culturas probióticas.

Houve manutenção de contagens de lactobacilos adequadas (acima de 10^7 UFC/mL) ao longo do armazenamento sob refrigeração (4-7°C), durante 28 dias.

Os resultados da análise sensorial dos leites fermentados armazenados por 14 e aos 28 dias sob refrigeração a 4-7°C indicaram uma igualdade de preferência pelos leites fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, que apresentaram uma mediana (4) correspondente ao grau de aceitação “gostei”.

Na análise por intenção de compra, o leite fermentado D1 teve 63,28% e o B7 teve 61,31% nos dois dias de armazenamento, indicando que mesmo sendo produzido com leite integral e sem sabores adicionados, estes produtos apresentaram uma boa aceitabilidade.

Portanto, a amostra de *L. rhamnosus* D1 parece ser o probiótico mais interessante na utilização em leites fermentados, sendo o leite de búfala fermentado uma opção viável para a veiculação do probiótico aos seres humanos pelas qualidades nutricionais relacionadas a este.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AATOURRI, N.; BOURAS, M.; TOME, D. *et al.* Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon-production. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.367–373, 2002.
- AHMAD, S.; ANJUM, F. M.; HUMA, N. *et al.* Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. *J. Anim. Plant. Sci.*, v.23, p. 62-74, 2013.
- ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.. *et al.* Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.351-354, 1999.
- ALMEIDA, E.F.L.; SOARES, M.O.O. Queijo artesanal: alternativa de Minas Gerais para a pecuária familiar. In: ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO LEITEIRO F1: AVANÇOS TECNOLÓGICOS. 6., 2008, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte: PUC MINAS, 2008. p.215-225.
- AMARAL, F. R. Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas. 2005. 46f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005a.
- AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N. *et al.* Qualidade do leite de búfalas: composição. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.29, p.106-110, 2005b.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. *Revista Educação Continuada do CRMV-SP*, v.2, p.59-71, 1999.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 de janeiro de 2012.
- ARAUJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.29, p.77-83, 2005.
- ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Rev. Immunol.*, v.8, p.411–420, 2008.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.
- BAJAJ, J.S.; HEUMAN, D.M.; HYLEMON, P.B. *et al.* Randomized clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.39, p.1113- 1125, 2014.

- BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. *Poult. Sci.*, v.72, p.1169-1173, 1993.
- BAKER, M.; EYLES, R.; BENNETT, J. *et al.* Emergence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in New Zealand. *N. Z. Public Health Rep.*, v.6, p.9-16, 1999.
- BAMBIRRA, F.H.S.; LIMA, K.G.C.; FRANCO, B.D.G.M. *et al.* Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.45, p.663-667, 2007.
- BANATVALA, N.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D. *et al.* The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J. Infect. Dis.*, v.183, p.1063-1070, 2001.
- BARBOSA, R. A.; PRUDÊNCIO, E. S.; GIOVANNI, R. N. *et al.* Formulação e elaboração de iogurte a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*), congelado e parcialmente desnatado. *Revista do ILCT*, v. 57, p. 31-34, 2002.
- BASTIANETTO, E.; ESCRIVÃO, S. C.; OLIVEIRA, D. A. A. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 29, p. 49-52, 2005.
- BENEVIDES, C.M. de J. Leite de búfala - qualidades tecnológicas. *Hig. Aliment.*, v.13, p.18-21, 1998
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, v.11, p. 259-274, 2001.
- BIXQUERT J.M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, v.101, p.553-564, 2009.
- BORGES, K. C.; MEDEIROS, A. C. L., CORREIA, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor Cajá (*Spondias lutea* L.): Caracterização físico-química e aceitação sensorial, entre indivíduos de 11 a 16 anos. *Alim. Nutr.*, v. 20, p. 295-300, 2009.
- BOURLIOUX, P. Histoire des laits fermentés. *Cah. Nutr. Diét.*, v.42, n.2, p.259-2514, 2007.
- BRAAT, H.; VAN DEN BRANDE, J.; VAN TOL, E. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.80, p.1618-1625, 2004.
- BRANDO, R.J.F.; MILIWEBSKY, E; BENTANCOR, L. *et al.* Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. *Clin. Exp. Immunol.*, v.153, p. 297-306, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução no 05, de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília, 2000.

BRASIL, 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.12, 10 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial da União, p. 1, 10/01/2001. Seção 1.

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília.

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília.

BRASIL, 2007. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 46 de 23/10/2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. IN: Documentos/Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2009. 30p. Disponível em <www.cnpat.embrapa.br>. Acessado em: 14 de setembro de 2015.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.57, p. 373-380, 2007.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods. *Br. J. Nutr.*, v.88, p. S165-S176, 2002.

CAMMAROTA, M.; DE ROSA, M.; STELLAVATO, A. *et al.* *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. *Int. J. Food Microbiol.*, v.135, p.90-98, 2009.

CAREY, C.M.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S. *et al.* The effect of probiotics and organic acids on shiga-toxin 2 expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Microbiol. Meth.*, v.73, p.125-132, 2008.

CARIDI, A. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.29, p.303-308, 2002.

CARLOS, I.Z., VENDRAMINI, A.P., VENDRAMINI, R.C, *et al.* Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: Prebióticos e probiótico: atualização e prospecção, Viçosa. Anais...UFV, p. 135-154, 2003.

CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.*, v.20, p.511-518, 2003.

- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. *et al.* Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Protect.*, v.61, p.1636-1643, 1998a.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. *et al.* Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, v. 84, n. 5, p. 759-768, 199b.
- CHATEAU A.N.; DESCHAMPS, M.; HADJ SASSI, A. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett. App. Microbiol.*, v.18, p.42-44, 1994.
- CHAWLA, A. K.; BALACHANDRAN, R. Studies on yoghurt buffalo milk: effect on different solids not fat content on chemical, rheological and sensory characteristics. *Indian J. Dairy Sci.*, v.47, p.762-765, 1994.
- CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R. *et al.* Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciênc. Rural*, v.37, n.2, 2007.
- CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*- an emerging problem? *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.*, v.41, p. 93–98, 2001.
- COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos. Disponível em:<http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119>. Acessado em 20 de setembro de 2015.
- COELHO, K. O.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. *et al.* Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 5, n. 3, p. 167-170, 2004.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, v.8, p.487-490, 1998.
- CONLAN, J.W.; PERRY, M. B. Susceptibility of three strains of conventional adult mice to intestinal colonization by an isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *Can. J. Microbiol.*, v.44, p.800-805, 1998.
- CONWAY, P. L.; GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, v.70, p.1-12, 1987.
- COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P. *et al.* Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, v.85, p.193-204, 2005.
- CORR, S. C.; LI, Y.; RIEDEL, C. U. *et al.* Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.104, p.7617-7621, 2007.
- CORREA, W. M.; CORREA, C. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, p.178-79.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B. *et al.* Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p.1858-1866, 2013.

CROSS, M. L.; MORTENSEN R. R.; KUDSK, J. *et al.*. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, v.191, p.49–53, 2002.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*, v.8, p.20-38, 2010.

CUNHA NETO, O. C.; OLIVEIRA C. A. F; HOTTA, R. M. *et al.* Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Cienc. Tecnol. Alimentos*, v. 3, n. 25, p.448-453, 2005.

DAVE, R.; SHAH, N.P. Viability of probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.*, v.7, p.31–41, 1997.

DE FRANCISCIS, G.; DI PALO, R. Buffalo milk production. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. Proceedings ... São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos.1994. p.137-145.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M. *et al.* Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v.10, p.37–54, 2008.

DE VUYST, L.; AVANTI, L.; MAKRAS, E. Probiotics, prebiotics and gut health. In: REMACLE, C.; REUSENS, B. (Eds.). *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Cambridge: Wood-head Publishing Ltd., p.416-482, 2004.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T. *et al.* Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.*, v.16, p.1181-1189, 2006.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, Maryland Heights, v.34, p.483-498, 2005.

DWORKIN, M; FALKOW, S; ROSENBERG, E. *et al.* The Prokaryotes. 3 ed. EUA: Springer Science + Business media. 2006. p.322-328.

EFSA- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Qualified presumption of safety. *The EFSA Journal*, v.587, p.4-6, 2007. Appendix A- Scientific Report on the Assessment of gram positive non sporuling bacteria.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER-MG). Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2004. 19p.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER-MG). Mapa do queijo- mapa Canastra. Disponível em:

<http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59>. Acessado em: 18 de setembro de 2015.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet, 2016. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>> Acessado em: 9 de janeiro de 2016.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: FAO/WHO, 2002. 11p.

FDA/CFSAN Bad Bug Book – EIEC - Enteroinvasive strains. Disponível em : <http://www.fda.gov> Acessado em: 20 de dezembro de 2015.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. Análise de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei* e suplementado com *Bifidobacterium longum*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, p. 407-414, 2006a.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesq. agropec. bras.*, v.41, p.511-516, 2006b.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Cur. Iss. Intest. Microbiol.*, v. 8, p 44-61, 2007.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Bacteriological analytical manual online, 8th Edition, Revision A, 2002. Chapter 4. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> Acessado em 15 dezembro de 2015.

FERREIRA, A.P.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, 2006, Anais... Chapecó, p.56-66, 2006.

FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação de efeito de prebiótico (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Arch. Vet. Sci.*, v.10, p.41-47, 2005.

FULLER, R.; GIBSON, G.R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroentero.*, v.32, p.28-31, 1997.

FURTADO, M. M. Composição centesimal do leite de búfala na zona da mata mineira. *Revista do ILCT*, v. 35, p.43-47, 1980.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C.; AZAMBUJA-FERREIRA, N. C. *et al.* Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação de viabilidade das bifidobactérias. *Revista do ILCT*, v. 67, p. 45-54, 2012.

GANGULI, N.C. Tecnologia de 1ª leite de búfala. *Rev. Mund. Zootec.*, v.30, p.2-10, 1979.

GARDE, S.; RODRIGUES, E.; GAYA, P. *et al.* PCR detection of the structural genes of

nisin Z and lacticin 481 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415, a strain isolated from raw milk Manchego cheese. *Biotechnol. Lett.*, v.23, p.85-89, 2001.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., 2004. Disponível em: http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf. Acessado em: 27 fevereiro 2015.

GILL, H. S.; SHU, Q.; LIN, H. *et al.* Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, v.190, p.97-104, 2001.

GILLILAND, S. E., NELSON, C. R., MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.49, p.377-381, 1985.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.64, p.263-265, 1980.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, v.10, p.139-157, 1999.

GOPAL, A.; SHAH, N.P.; ROGINSKI, H. Bile tolerance, taurocholate and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft*, v.51, p.619-622, 1996.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim. Pol.*, v.52, p.665-671, 2005.

GRANGETTE, C.; NUTTEN, S.; PALUMBO, E. *et al.* Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.102, p.10321-10326, 2005.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003.

GUEDES NETO, L.G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp. e de bactérias ácido-láticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.245-250, 2005.

GUILLOT, J.F. The pros and cons of probiotics – make probiotics work poultry. *Feed Mix*, v.23, p.28-30, 2000.

- HAMMES, W.; HERTEL, C. Genus *Lactobacillus*. In: DE VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D. *et al.* (2a Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Heidelberg, Springer, p. 465–510, 2009.
- HILBORN, E. D.; MERMIN, J.H.; MSHAR, P. A. *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.*, v.159, p. 1758-1764, 1999.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. of Clin. Nutr.*, v.73, p.365-373, 2001.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int.*, v.35, p. 109-116, 2002.
- HOOVER, L. V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Rev. Microbiol.*, v.7, p.367–374, 2009.
- HOSONO, A. Fermented Milk in the Orient. In: *Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences*, Y. Nagasawa, A. Hosono (Eds.), Elsevier Applied Science, London, UK, p.61–78, 1992.
- HÜHN, S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; MOURA CARVALHO, L.O.D. *et al.* Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. Anais. Belém: Embrapa CPATU, 1986. v.5, p.265-269. (Embrapa-CPATU. Documentos, 36).
- HÜHN, S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B.; MOURA CARVALHO, L.O.D. *et al.* Características, peculiaridades e tecnologia do leite de búfala. Belém: Embrapa CPATU, 1991. 51p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 57).
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Confronto dos resultados dos dados estruturais dos censos agropecuários Região Norte-1970/2006. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acessado em: 2 de março de 2014.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Determination of titratable acidity. *Bulletin of International Dairy Federation*, n.150, p.1-2, 1991.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. *Bulletin of International Dairy Federation*, n.117B, p.1-4, 1997.
- JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 790p.
- JIN, L.Z.; HO, YW.; ABOULLAH, N. *et al.* Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian Austral. J. Anim.*, v.9. p.397-404, 1996.

- JIN, L.Z.; HO, YW.; ABOULLAH, N. *et al.* Probiotics in poultry: modes of action. *World Poult. Sci. J.*, v.53, p.351-68, 1997.
- KANDLER, O.; WAISS, N. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2; Garrity, G.M. Ed., Williams, J.G. and Wilkins Co.: Baltimore, Md. 1986. p. 1209–1234.
- KARPMAN, D.; COUNCIL, H.; SVENSSON, M. *et al.* The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J. Infect. Dis.*, v. 175, p. 611-620, 1997.
- KIM, Y.; HAN, K.S.; IMM, J.Y. *et al.* Inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* lysates on the cytotoxic activity of shiga-like toxin 2 produced from *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.43, p.502–507, 2006.
- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.101, p.229-241, 2001.
- KUMAR, M.; VERMA, V.; NAGPAL, R. *et al.* Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1 induced liver carcinogenesis in rats. *Br. J. Nutr.*, v.107, p. 1006–1016, 2011a.
- KUMAR, M.; VERMA, V.; NAGPAL, R. *et al.* Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB1-induced hepatocellular carcinoma. *Gene*, v.490, p.54–59, 2011b.
- LAN, R.; ALLES, M.C.; DONOHOE, K. *et al.* Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.*, v.72, p.5080-5088, 2004
- LAUGHTON, J. M.; DEVILLARD, E.; HEINRICHS, D. E. *et al.* Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol.*, v. 152, p.1155-1167, 2006.
- LEAO, M.V.P.; SILVA, C.R.G.; SANTOS, S.S.F. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v.37, p.417-420, 2015.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.8, p.171-184, 2010.
- LEE, J.; AMETANI, A.; ENOMOTO, A. *et al.* Screening for the immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.57, p.2127-32, 1993.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, Cambridge, v.6, p. 241-245, 1995.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S. *et al.* *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999, 211p.

- LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L.; OKAMOTO, A. S. *et al.* Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can. J. Vet. Res.*, v.71, p.103-107, 2007.
- LIU, X.; CAO, S.; ZHANG, X. Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet. *J. Agr. Food Chem.*, v.63, p.7885-7895, 2015.
- LONNERMARK, E.; FRIMAN, V.; LAPPAS, G. *et al.* Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *J. Clin. Gastroenterol.*, v.44, p. 106-112, 2010.
- MACK, D. R.; AHRNE, S.; HYDE, L. *et al.* Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, v.52, p.827-833, 2003.
- MACPHERSON, A.J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Sci.*, v.303, p.1662-1665, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 12^a edição, São Paulo: Artmed, 2010, 1160p.
- MANGELL, P.; THORLACIUS, H.; SYK, I. *et al.* *Lactobacillus plantarum* 299v does not reduce enteric bacteria or bacterial translocation in patients undergoing colon resection. *Dig. Dis. Sci.*, v.57, p.1915-1924, 2012.
- MANN, G.V.; SPOERRY, A. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.27, p.464-469, 1974.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Bovinos e Bubalinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acessado em: 16 de dezembro de 2015.
- MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; GOMES, D.A. *et al.* Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. *Arch. Microbiol.*, v. 192, p. 995-1003, 2010.
- MATSUO, K.; OTA, H.; AKAMATSU, T. *et al.* Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*, v.40, p.782-789, 1997.
- MATTIA, A.; MERKER, R. Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: pre-market approval or "Generally Recognized as Safe" notification. *Clin. Infect. Dis.*, v.46, p. S115-S118, 2008.
- MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; WEILL, R. *et al.* Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *J. Dairy Sci.*, v.72, p. 243-249, 2005.

MENESES, J.N.C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil*. Dossiê interpretativo. Volume I. 2006. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>> Acessado em 25 de janeiro de 2014.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba, SBZ, p.141-157, 2001.

MEURMAN, J. H., ANTILA, H.; SALMINEN, S. Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v.7, p.295– 298, 1994.

MINAS GERAIS, 2002 Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto no 42.645, de 5 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei no 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Minas Gerais, Belo Horizonte, 6 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 11 de outubro de 2015.

MINAS GERAIS, 2008. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo de minas artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 11 de outubro de 2015.

MINAS GERAIS, 2004. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 694 de 17 novembro 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2004. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/276-portaria-694>. Acessado em: 03 de janeiro de 2014.

MINAS GERAIS, 2009. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 1.022 de 03 de novembro de 2009. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2009. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acessado em: 10 de outubro de 2015.

MIRZAEI, H.; SHAHIRFAR, H.; MOBAYEN, H. Effect of consumption of fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* isolated from Ligvan cheese against *E. coli* O157:H7 induced infections in Balb/C mice. *Life Sci. J.*, v.9, p.5895-5898, 2012.

MIZOCK, B.A. *Probiotics. Dis Mon*, v.61, p.259–29, 2015.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; TONHATI, H. *et al.* Variação das características físico-químicas do leite de búfala, durante os diferentes meses do período de lactação. *Artigos de Veterinária*, v.12, p.148-153, 1996.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. *et al.* Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.334, p.1-15, 2012.

NAMJOO, M.; TAHERI, A; TAHERI, F. Fermented milk *Bifidobacterium angulatum* and infection induced by *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Res. J. Biol. Sci.*, v. 7, p. 285-289, 2012.

- NASE, L.; HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E. *et al.* Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.*, v.35, p.412–420, 2001.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, p. 142-201, 1998.
- NEAL, C. E., CALBERT, H. E., The use of 2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *J. Food Prot.*, v. 38, n. 6, p. 629 – 633, 1955.
- NERES, L.S.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; NAHÚM, B.S. *et al.* Perfil sensorial de leite de búfala fermentado sabor acerola (*Malpighia glabra*). In: III Congresso Brasileiro de Processamento de Frutas e Hortaliças- CBPH, Magistra, Cruz das Almas – BA, v. 26, p.2077-2080, 2014.
- NERI, P.; NAGANO, S.I.; YOKOYAMA, S.I. *et al.* Neutralizing activity of polyvalent Gb3, Gb2 and Galacto-Trehalose models against Shiga toxins. *Microbiol. Immunol.*, v.51, p.581–592, 2007.
- NISSEN, L.; CHINGWARU, W.; SGORBATI, B. *et al.* Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. Strains: a functional study in the small intestinal cell model. *Int. J. Food Microbiol.*, v.135, p.288-294, 2009).
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, v.241, p.210-I, 1973.
- OCHOA, T. J.; CLEARY, T. G. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr. Opin. Infec. Dis.*, v.16, p.259-263, 2003.
- OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.300, p.57–62, 2010.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K., NOMOTO, K. *et al.* Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strain due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.*, v.68, p.135-140, 2001.
- ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.
- O’SULLIVAN, J.; BOLTON, D. J.; DUFFY, G. *et al.* Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. Co- ordination action FOOD-CT-2006-036256. Project “*Pathogenic Escherichia coli Network*” (PEN), Teagasc, Dublin, 2007, 32p.
- OUOBA, L.I.I.; LEI, V.; JENSEN, L.B. Resistance of potencial probiotic lactic acid bacteria and of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v.121, p. 217-224, 2008
- PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.252, p.11–18, 2005.

- PASSARIELLO, A.; AGRICOLE, P.; MALFERTHEINER, P. A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in gastrointestinal diseases. *Curr. Med. Res. Opin.*, v.30, p.1055-1064, 2014.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M. *et al.* Influence of the use of *Lactobacillus casei* as na oral adjuvant on lhe levels of secretory immunoglobolin A during infection with *Salmolletta typhimurium*. *Food Agr. Immunol.*, v.5, p.27-37, 1993.
- PERDIGÓN, G., HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller, R., Perdígón, G. Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000, 213-233p.
- PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, p.4689–4693, 2002.
- PESSI, T.; SÜTAS, Y.; HURME, M. *et al.* Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin. Exp. Allergy*, v.30, p.1804–1808, 2000.
- PETRI, R. Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil. II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria-RS, Anais... 2000.
- PHILIP, R.; EPSTEIN, L. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, c-interferon and interleukin-1. *Nature*, v.323, p.86–89, 1986.
- PINYON, R.A.; PATON, J.C.; PATON, A.W. *et al.* Refinement of a therapeutic Shiga toxin-binding probiotic for human trials. *J. Infect. Dis.*, v.189, p.1547–1555, 2004.
- PULUSONI, S.R.; RAO, D.R. Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed *Thermophilus bulgaricus* and acidophilus milks. *J. Food Sci.*, v.48, p.280–281, 1983.
- QIN, H.; ZHANG, Z.; HANG, X. *et al.* *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction protein changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.*, v.9, p.1-9, 2009.
- QUEIROZ, L. S. O.; JÚNIOR, J. B. L.; VIEIRA, L. C. *et al.* Avaliação microbiológica de iogurte de leite de búfala, com sabor de frutas da Amazônia, para merenda escolar. *Hig. Aliment.*, v.16, p.39-44, 2002.
- RAITANO, A.; KORE, M. Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 associated with enhanced expression of c-interferon receptors. *Cancer Res.*, v.53, p.636–640, 1993.
- REDDY, B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.*, v.129, p.1478S–1482S, 1999.
- RESENDE, M.F.S., COSTA, H.H.S., ANDRADE E.H.P. *et al.* Queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-lácticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1532-1538, 2011.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.*, v.2, p. 361–367, 2001.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, v.52, p.988-97, 2003.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I. et al. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en argentina, diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*, v.66, p.27–32, 2006.

ROCHA, C.; VOBUCCI, R. M. A.; MAITAN, V. R. et al. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 26, p. 255-266, 2008.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J.A. et al. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *J. Food Sci.*, v.74, p.284-293, 2009

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, v.84, p.197–215, 2000.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SANTA ROSA, R.M.S. *Iogurte de leite de búfala adicionado de polpa de frutas da Amazônia: parâmetros de qualidade*. 2011. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, 2011. 85p

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Resolução SAA n°. 24 de 01 de agosto de 1994. Normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal, atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. Disponível em www.cda.gov.br/legislacoes. Acesso em 26/11/2015.

SAVINO, F.; CORDISCO, L.; TARASCO, V. et al. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC Microbiol.*, v.11, p.157, 2011.

SAVIOLLI, J.Y. *Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo*. 2010. 84 f. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo.

SEKINE, K.; WATANABE-SEKINE, E.; TOIDA, T. *et al.* Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vivo* immune responses in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, v.16, p.589-609, 1994.

SHARPE, M., E. The genus *Lactobacillus*, In *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*; Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H.G. *et al.* Eds. Springer-Verlag: Berlin, 1981; 1653 p.

SHEEHAN, W. J.; PHIPATANAKUL, W. Tolerance to water buffalo milk in a child with cow allergy. *Ann. Allergy Astma Immunol.*, v.102 n.349, p. 2009

SHORTT, C. The probiotic century: Historical and current perspectives, *Trends Food Sci. Technol.*, v. 10, p.411–417, 1999.

SHU, Q.; GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 34, p. 59-64, 2002.

SCHOLZ, M. B; ANTUNES, L. A. F. Aproveitamento da mistura de leite de vaca e de búfala para a produção de iogurte. Aspectos físico-químicos e microbiológicos. *Revista do ILCT.*, v.50, p.30-46, 1996.

SCHULTZ, M.; GOTTL, C; YOUNG, R. J. *et al.* Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 38, p.293–297, 2004.

SENA, M. J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijo coalho comercializados em Recife – PE.* 2000. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, R. M.; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, v.11, p.441-444, 1980.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *Buffalo J.*, v.10, p.133-137, 1994.

SILVA, E.N.; ALVES FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. Anais... 2000.

SILVA, M. S. T.; LOURENÇO Jr., J. B.; MIRANDA, H. A. *et al.* Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF. Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em: <www.cpatu.br/bufalo>. Acessado em 18 de fevereiro de 2014.

SILVA, C.A.; HOSHI, E.H.; PACHECO, G.D. *et al.* Avaliação de probiótico (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho de leitões. *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, p 133-140, 2006.

SILVA, J.G. *Características físicas, físico químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra*. 2007. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SMITH, H.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T. *E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK. *Microbiology Today*, v.31, p.117-118, 2004.

SWERDLOW, D. L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C. *et al.* A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.*, v.117, p.812-819, 1992.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SPIER, M.R. *et al.* The Potential of Probiotics. *Food Technol. Biotechnol.*, v.48, p.413–434, 2010.

SOMBOON, T.; TAKAYUKI, E.; KEN-ICHIRO, S. *et al.* Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.38, p.121–134, 1992.

ST-ONGE, M.P.; FARNWORTH, E.R.; JONES, P.J.H. Fermented and non-fermented dairy product consumption: effects on cholesterol levels and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.71, p.674–681, 2000.

STAVRIC, S. Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. *Food Technol.*, v.3, p.93-98, 1987.

SUNANLIGANON, C.; THONG-NGAM, D.; TUMWASORN, S. *et al.* *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J. Gastroenterol.*, v.18, p.2472-2480, 2012.

SÜTAS, Y.; SOPPI, E.; KORHONEN, H. *et al.* Suppression of lymphocyte proliferation in-vitro by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.98, p.216–224, 1996.

SUVARNA, V.C.; BOBY, V.U. Probiotics in human health: A current assessment. *Current Sci.*, v.88, p.1744-1748, 2005.

SZAJEWSKA, H.; SKORKA, A.; RUSZCZYNSKI, M. *et al.* Metaanalysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children – updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.38, p.467-476, 2013.

TAGG, J. R.; DAJAMI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bact. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 56, p. S2-S15, 2002.

TAMIME, A. Y.; SAARELA, M.; SONDERGARD, A. K. *et al.* Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In *Probiotic Dairy Products*, p. 39–72. Tamime A, ed. Oxford: Blackwell Publishing. 2005, 216p.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a pre requisite for the development of probiotics. *Int. Dairy J.*, v.8, p.527-33, 1998.

THRONTON, G. M. *Probiotic bacteria selection of Lactobacillus and Bifidobacterium strains from the healthy human gastrointestinal tract, characterization of a novel Lactobacillus-derived antibacterial protein* (thesis), National Univ., Ireland, 1996.

TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food. Micro.*, v. 35, n. 1, p. 49–56, 1997.

TIZARD, I. *Veterinary Immunology: an introduction*. 4. ed. Saunders, Philadelphia. 1992, 545p.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. Probióticos, prebióticos e simbióticos. In: TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Os probióticos e a saúde infantil. (Temas de Pediatria Nestlé, 3). São Paulo: Nestlé, 2000. p.15.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. Editora Atheneu, 4º Ed., p.269-310, 2004, 780p.

TODOROV, S. V.; MELO FRANCO, B. D. G. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Ver. Int.*, v.26, p.205–229, 2010.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. *Microbiologia*. Editora Artmed, 10º Ed, 2012, 934p.

TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, v.41, p.45-51, 1998.

TUOMOLA, E. M.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 26, p.137–142, 1999.

UKENA, S. N.; SINGH, A.; DRINGENBERG, U. *et al.* Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One*, v.2, p. e1308, 2007.

USDA (United States Department of Agriculture). Milk for manufacturing purposes and its production and processing: recommended requirements. 2011. <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004791>

UTIYAMA, C.E. *Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de leitões recém-desmamados*. 2004. 110f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2004.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.

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

VÉLEZ, M. P.; VERHOEVEN, T. L. A.; DRAING, C. *et al.* Functional analysis of Dalanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, p. 3595– 3604, 2007.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M.; Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci. agric.* (Piracicaba, Braz.), v.51, p.131-137, 1994. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf>>. Acessado em 27 de setembro de 2015.

VIANNI, M. C. E.; LAZARO, N. S.; SANTANA, D. M. N. *et al.* Qualidade Microbiológica do Leite "in natura de Rebanhos Bubalinos do Estado do Rio de Janeiro. *Hig. Aliment.*, v.14, p.69-72, 2000.

VIEGAS, R. P. *Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-láticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.* 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T.C. *et al.* Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo de coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.460-467, 2010.

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

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

WEI, C. H.; LIU, J. K.; HOU, X. L. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99. *Vaccine*, v. 28, p. 4113-4118, 2010.

WILSON, K.H.; PERINI, F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect. Immun.*, v.56, p.2610-2614, 1988.

YABU, M. C.; SCHOLZ, M. B. S.; RAPACCI, M. *et al.* Características físico-químicas e sensoriais de iogurte produzido de misturas de leite bovino e bubalino. *Revista do ILCT.*, v.43, p.35-37, 1988.

YASUI, H; OHWAKI, M. Enhancement of immune response in Peyer patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.1187-95, 1991.

ZHOU, J.S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K.J. *et al.* Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *Int. J. Food Microbiol.*, v.56, p.87-96, 2000.

ZYREK, A. A.; CICHON, C.; HELMS, S. *et al.* Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.*, v.9, p.804-816, 2007.

ANEXOS

ANEXO I: Resultados (médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos de três repetições) dos testes de antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láticas contra microrganismos indicadores

Amostras produtoras	Micro-organismos indicadores						
	A	B	C	D	E	F	G
<i>L. plantarum</i> A17	0a	0a	0a	37,04b	73,82b	56,18b	35,75b
<i>L. casei</i> A21	0a	0a	0a	37,27b	67,10b	48,68b	33,82b
<i>L. rhamnosus</i> A23	0a	0a	0a	47,90b	60,87b	57,13b	42,03b
<i>L. rhamnosus</i> B4	3,53a	0a	0a	41,20b	64,21b	45,12b	23,01b
<i>L. casei</i> B5	0a	0a	0a	47,07b	66,16b	55,95b	32,47b
<i>L. plantarum</i> B7	3,19a	0a	0a	32,24b	71,38b	61,41b	24,42b
<i>L. plantarum</i> D13	0a	0a	0a	36,43b	73,77b	41,93b	34,54b
<i>L. plantarum</i> B19	2,85a	5,16a	0a	57,11b	74,48b	63,16b	49,99b
<i>L. casei</i> C7	0a	0a	0a	33,91b	45,52b	41,74b	20,98b
<i>W. paramesenteroides</i> C10	0a	0a	0a	51,57b	60,63b	59,16b	29,64b
<i>L. rhamnosus</i> D1	0a	5,57a	0a	41,87b	62,64b	49,32b	48,08b
<i>L. hilgardii</i> D8	0a	0a	0a	34,91b	72,78b	60,29b	38,04b

Legenda: A = *Lactococcus* sp. B12, B = *L. rhamnosus* B25, C = *L. fermentum* ATCC9338, D = *Escherichia coli* ATCC 25922, E = *L. monocytogenes* ATCC 15313, F = *S. typhimurium* ATCC 14028 e G = *S. aureus* ATCC 29313

Resultados seguidos por letras minúsculas distintas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de KruskalWallis

Fonte: Costa et al, 2013

ANEXO II: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de 12 amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal

Amostra	Antimicrobiano									
	CAZ	CIP	DA	E	GN	OX	P	S	T	VA
<i>L. casei</i> A21	R	R	S	S	S	R	MS	R	S	R
<i>L. casei</i> B5	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
<i>L. casei</i> C7	R	R	S	S	S	R	MS	R	S	R
<i>L. rhamnosus</i> A23	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
<i>L. rhamnosus</i> B4	R	MS	S	S	S	R	MS	R	S	R
<i>L. rhamnosus</i> D1	R	MS	S	S	S	R	S	R	S	R
<i>L. plantaraum</i> A17	R	R	S	S	R	R	MS	R	S	R
<i>L. plantaraum</i> B7	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R
<i>L. plantaraum</i> B19	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R
<i>L. plantaraum</i> D13	R	R	S	S	S	R	MS	R	S	R
<i>L. hilgradii</i> D8	R	R	S	S	R	R	MS	R	S	R
<i>W. paramesenteroides</i> C10	R	MS	S	S	S	R	MS	R	S	R

Legenda: CAZ (ceftazidima-30 µg), DA (clindamicina -2µg), CIP (ciprofloxacina-5µg), E (eritromicina-15µg), GN (gentamicina-10µg), OX (oxacilina-1µg), PEN (penicilina-10U), S (estreptomicina-30µg), TE (tetraciclina-30µg),VA(vancomicina-30µg)

R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível

Fonte: Costa et al, 2013

ANEXO III: Percentual de inibição de 12 amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, em pH gástrico e sais biliares, nos tempos 6 e 12 horas de crescimento

Amostras	<u>% inibição pH gástrico</u>		<u>% inibição sais biliares</u>	
	6h	12h	6h	12h
<i>L. casei</i> A21	32,74	19,68	78,35	80,86
<i>L. casei</i> B5	03,16	00,00	82,12	81,06
<i>L. casei</i> C7	00,00	00,00	59,42	69,80
<i>L. rhamnosus</i> A23	58,70	05,02	70,29	73,10
<i>L. rhamnosus</i> B4	27,93	10,99	62,40	67,24
<i>L. rhamnosus</i> D1	00,00	08,10	79,80	77,64
<i>L. plantaraum</i> A17	17,55	02,55	88,81	89,73
<i>L. plantaraum</i> B7	18,86	18,99	42,95	33,74
<i>L. plantaraum</i> B19	00,00	00,00	14,82	04,74
<i>L. plantaraum</i> D13	04,47	00,00	27,89	46,31
<i>L. hilgradii</i> D8	16,62	10,06	88,81	89,73
<i>W. paramesenteroides</i> C10	01,19	01,95	62,20	66,13

Fonte: Costa et al, 2013

ANEXO IV: Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética No Uso De Animais – CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Marcelo Resende de Souza,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação do efeito protetor de lactobacilos de queijo Minas artesanal na infecção experimental por *Escherichia coli* e *L. monocytogenes*, submetido a esta comissão pelo protocolo 80 / 2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 11/05/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 12/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO V: Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética Em Pesquisa – COEP, da Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 48320015.1.0000.5149

Interessado(a): Prof. Marcelo Resende de Souza
Departamento de Tecnologia e Inspeção Animal
Escola de Veterinária - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de outubro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito protetor de lactobacilos de queijo de Minas artesanal na infecção experimental de Escherichia coli e Listeria monocytogenes**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO VI: Médias de pH e contagens de bactérias ácido-láticas (log UFC/mL), de três repetições de leite de búfala fermentados com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, nos tempos de fermentação de 0 a 26 horas

Tempos (horas)	Cont. UFC log ₁₀ /mL		pH	
	B7	D1	B7	D1
0	7,54 Aa	7,01 Aa	6,47Aa	6,50 Aa
2	7,22 Aa	7,07 Aa	6,39 Aa	6,45 Aa
4	7,11 Aa	7,67 Aa	6,52 Aa	6,49 Aa
6	8,37 Aa	8,38 Aa	6,32 Aa	6,26 Aa
8	7,40 Aa	7,45 Aa	6,27 Aa	6,32 Aa
10	7,48 Aa	7,53 Aa	6,18 Aa	6,16 Aa
12	7,55 Aa	7,73 Aa	5,96 Ba	5,91 Ba
14	7,64 Aa	7,53 Aa	5,86 Ba	5,78 Ba
16	7,29 Aa	7,65 Aa	5,65 Ca	5,66 Ca
18	7,79 Aa	7,07 Aa	5,45 Da	5,47 Da
20	8,34 Aa	7,27 Aa	5,39 Ea	5,33 Ea
22	7,86 Aa	7,81 Aa	5,36 Ea	5,23 Ea
24	8,18 Aa	7,58 Aa	5,16 Fa	5,06 Fa
26	7,58 Aa	8,17 Aa	4,97 Ga	4,88 Ga
Média	7,66	7,56	5,85	5,82
Desvio-padrão	0,39	0,39	0,52	0,55

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05)
 Letras minúsculas iguais entre as colunas não indicam diferença estatística significativa (p>0,05)

ANEXO VII: Médias de pH e contagens de bactérias ácido lácticas (Log_{10} UFC/mL), de três repetições de leites de búfala fermentados por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, armazenados a 4-7 °C

Tempos (dias)	Cont. UFC $\text{log}_{10}/\text{mL}$		Tempos (dias)	pH	
	B7	D1		B7	D1
1	8,10 Aa	7,51 Aa	1	4,80Aa	4,75Aa
13	7,78 Aa	7,65 Aa	14	4,34 Ba	4,23 Ba
27	8,03 Aa	8,02 Aa	28	4,07 BCa	3,98 Ca
Média	7,97	7,72	Média	4,40	4,32
Desvio- padrão	0,168	0,263	Desvio- padrão	0,369	0,392

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Letras minúsculas iguais entre as linhas não indicam diferença estatística significativa ($p > 0,05$)