

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1 contra *Listeria monocytogenes* na infecção experimental e produção de leite fermentado de cabra

Gustavo Lucas Costa Valente

**BELO HORIZONTE - MG
2018**

Gustavo Lucas Costa Valente

Potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1 contra *Listeria monocytogenes* na infecção experimental e produção de leite fermentado de cabra

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

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Cláudia Freire de Andrade Morais Penna

Co-orientadores: Marcelo Resende de Souza e Andréia Marçal da Silva

**BELO HORIZONTE - MG
2018**

V154p Valente, Gustavo Lucas Costa, 1990-
Potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1
contra *Listeria monocytogenes* na infecção experimental e produção de leite fermentado de
cabra / Gustavo Lucas Costa Valente. – 2018.
84 p. : il.

Orientadora: Cláudia Freire de Andrade Morais Penna
Co-orientadores: Marcelo Resende de Souza, Andréia Marçal da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Queijo-de-minas – Teses. 2. Leite de cabra – Teses. 3. Leite fermentado – Teses.
4. Lactobacilo – Teses. 5. Listeria – Teses. 6. Probióticos – Teses. I. Penna, Cláudia Freire de
Andrade Morais. II. Souza, Marcelo Resende de. III. Silva, Andréia Marçal da. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 637.17

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUSTAVO LUCAS COSTA VALENTE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 05 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Claudia Freire de Andrade Morais Penna

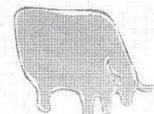
Profª. Claudia Freire de Andrade Morais Penna
Presidente - Orientador

Jacques Robert Nicoli

Prof. Jacques Robert Nicoli
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Patrícia Vilhena Dias de Andrade

Drª. Patrícia Vilhena Dias de Andrade
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e sabedoria.

Aos meus pais, Sandra e Fernando, pela base, incentivo e orientação fornecida. À minha irmã, Stefânia, por todo o apoio. À Laila e Olívia pelos momentos de descontração.

À Ursula por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, me ajudando e apoiando em todas as decisões, e a toda sua família.

À professora Cláudia pela orientação e disponibilidade em sempre ajudar.

Ao professor Marcelo pela orientação, conhecimentos compartilhados e por ter aberto as portas para que eu seguisse uma carreira acadêmica.

À professora Andréia pela orientação e por sempre demonstrar interesse em contribuir com o projeto.

Ao Leonardo Acurcio pela paciência e ajuda fundamental em todas as etapas desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) por todos os ensinamentos. Aos funcionários do DTIPOA pelos auxílios prestados, em especial ao Marco Antonio, Maura, César, Miltinho e Cosme.

À equipe do LabUFMG pela cooperação da realização de análises de composição e de contagem bacteriana no leite cru de cabra.

Aos colegas de laboratório e mestrado, Carla, Gabriela, Letícia, Naiara, Ana, Cláudia, Érica, Sarah, Victor, Viviane, e em especial ao Felipe, Ranier e Marcela pela ajuda indispensável nas análises sensoriais. Aos alunos de IC, Luigi Freitas e Bárbara Couto pelo auxílio e dedicação.

Aos professores Jacques e Elisabeth por disponibilizarem todas as condições para a experimentação animal. A todo grupo do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM) pelo auxílio.

Ao colegiado de pós-graduação e a CAPES, pela bolsa concedida.

Aos animais utilizados no experimento, todo meu respeito.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	7
	ABSTRACT.....	8
1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	OBJETIVO.....	10
2.1.	Objetivos geral.....	10
2.2.	Objetivos específicos.....	10
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1.	Queijo Minas artesanal.....	11
3.2.	Bactérias ácido-lácticas.....	12
3.3.	<i>Lactobacillus</i> spp.....	13
3.4.	Probióticos.....	13
3.4.1.	Definição.....	13
3.4.2.	Histórico.....	14
3.4.3.	Utilizações.....	15
3.4.4.	Mecanismos de ação.....	16
3.4.4.1.	Produção de substâncias inibidoras.....	16
3.4.4.2.	Proteção da barreira epitelial.....	18
3.4.4.3.	Modulação da resposta imune do hospedeiro.....	18
3.5.	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.5.1.	Características do agente.....	19
3.5.2.	Listeriose e sua importância epidemiológica.....	19
3.5.3.	Antagonismo de bal contra <i>L. monocytogenes</i>	21
3.6.	Leites fermentados.....	22
3.6.1.	Leite fermentado de cabra.....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.	Micro-organismos utilizados.....	24
4.1.1.	Amostras de bactérias ácido-lácticas.....	24
4.1.2.	Amostra de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
4.2.	Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i>	25
4.2.1.	Resistência a antimicrobianos.....	25
4.2.2.	Resistência <i>in vitro</i> ao ácido gástrico artificial.....	27
4.2.3.	Resistência <i>in vitro</i> aos sais biliares.....	27
4.2.4.	Teste de antagonismo <i>in vitro</i> – “spot on the lawn”.....	28
4.3.	Teste de proteção <i>in vivo</i>	29
4.3.1.	Animais.....	29
4.3.2.	Determinação de modelo de infecção experimental.....	29
4.3.3.	Curva de sobrevivência e desenvolvimento ponderal.....	30
4.4.	Elaboração de leite fermentado de cabra por <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1.....	30
4.4.1.	Obtenção e avaliação da qualidade do leite de cabra cru.....	30
4.4.2.	Determinação da curva de fermentação das culturas testadas.....	31
4.4.3.	Elaboração do leite fermentado de cabra para os testes de aceitação.....	31
4.4.4.	Análises físico-químicas dos leites fermentados.....	31
4.4.5.	Análises microbiológicas dos leites fermentados.....	32
4.4.6.	Teste de análise sensorial dos leites fermentados.....	32
4.5.	Análises estatísticas.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1.	Potencial probiótico <i>in vitro</i> de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1.....	33
5.1.1.	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	33
5.1.2.	Resistência ao ácido gástrico artificial e sais biliares.....	36
5.1.3.	Antagonismo <i>in vitro</i>	37
5.1.3.1.	<i>Lactobacillus</i> spp. contra <i>L. monocytogenes</i>	37
5.1.3.2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> B7 contra <i>Lactobacillus rhamnosus</i> D1.....	39

5.2.	Teste de proteção <i>in vivo</i>	39
5.2.1.	Modelo de infecção experimental.....	39
5.2.2.	Curva de sobrevivência.....	41
5.2.3.	Desenvolvimento ponderal.....	43
5.3.	Leite fermentado de cabra com <i>Lactobacillus</i> spp.....	45
5.3.1.	Avaliação do leite de cabra cru.....	45
5.3.2.	Curva de fermentação do leite de cabra pelos lactobacilos.....	46
5.3.3.	Parâmetros físico-químicos antes e durante a estocagem.....	48
5.3.4.	Parâmetros microbiológicos durante a estocagem.....	50
5.3.5.	Análise sensorial dos leites fermentados.....	55
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8.	ANEXOS	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classes e propriedades de bacteriocinas produzidas por probióticos	17
Tabela 2.	Incidência de <i>L. monocytogenes</i> em produtos lácteos	20
Tabela 3.	Distribuição de casos de listeriose de 1998 a 2016 nos EUA	21
Tabela 4.	Distribuição do rebanho caprino no Brasil em 2016	23
Tabela 5.	Discos de antimicrobianos utilizados no antibiograma	26
Tabela 6.	Níveis de sensibilidade de <i>Lactobacillus</i> spp. à antimicrobianos de acordo com as médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) no teste de antibiograma	26
Tabela 7.	Probióticos comerciais utilizados para comparação de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 contra <i>Listeria monocytogenes</i>	28
Tabela 8.	Vias de inoculação e doses de <i>L. monocytogenes</i> para estabelecimento de um modelo murino de infecção experimental	29
Tabela 9.	Sensibilidade de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 isolados de QMA da Serra da Canastra –MG à antimicrobianos	34
Tabela 10.	Sensibilidade de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1 isolados de QMA da Serra da Canastra –MG à antimicrobianos segundo Costa <i>et al.</i> (2013)	35
Tabela 11.	Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância (tolerante – T, moderadamente tolerante – MT, sensível – S), ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e aos sais biliares de <i>L. plantarum</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1, isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG	36
Tabela 12.	Progressão clínica de listeriose em camundongos BALB/c após infecção intravenosa experimental (veia caudal)	40
Tabela 13.	DL ₅₀ apresentada por amostras de <i>L. monocytogenes</i> após infecção experimental intraperitoneal em camundongos A/J	43
Tabela 14.	Médias e desvios-padrão de resultados de análises de composição química, CCS e CBT do leite de cabra cru, considerando três repetições – lotes distintos	45
Tabela 15.	Parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite fermentado de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1 e ambos (M) em diferentes tempos de fermentação	49
Tabela 16.	Acidez titulável dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	50
Tabela 17.	pH dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	51
Tabela 18.	Teor de ácidos graxos livres dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	52
Tabela 19.	Teor de gordura dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	52

Tabela 20.	Teor de proteína dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	53
Tabela 21.	Teor de extrato seco total dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	54
Tabela 22.	Teor de cinzas dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	54
Tabela 23.	Aceitação de leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	56
Tabela 24.	Intenção de compra dos leites fermentados de cabra por <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA em diferentes dias de estocagem a 7°C	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. contra <i>L. monocytogenes</i> . Legenda: B7 – <i>L. plantarum</i> ; D1 – <i>L. rhamnosus</i> ; AC, EL, IT, PA, VI, YA – <i>L. casei</i> ; CH – <i>L. paracasei</i> ; LGG – <i>L. rhamnosus</i> GG; CH – <i>L. paracasei</i> .	38
Figura 2.	Sobrevida (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com <i>L. plantarum</i> B7 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ UFC) via veia caudal	41
Figura 3.	Sobrevida (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com <i>L. rhamnosus</i> D1 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ UFC) via veia caudal	41
Figura 4.	Peso relativo (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com <i>L. plantarum</i> B7 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ UFC) via veia caudal (dia 11)	44
Figura 5.	Peso relativo (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com <i>L. rhamnosus</i> D1 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ UFC) via veia caudal (dia 11)	44
Figura 6.	Médias de pH durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por <i>Lactobacillus plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1 e ambos (M)	47
Figura 7.	Médias de acidez titulável durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por <i>Lactobacillus plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1 e ambos (M)	47
Figura 8.	Médias de contagem bacteriana durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por <i>Lactobacillus plantarum</i> (B7), <i>L. rhamnosus</i> D1 e ambos (M)	48
Figura 9.	Contagem de <i>L. plantarum</i> B7, <i>L. rhamnosus</i> D1, ambos (M) e <i>L. casei</i> YA nos leites fermentados e armazenados a 7°C por 0, 15 e 30 dias. Teste de Tükey (p<0,05).	55

RESUMO

Lactobacillus spp. são bactérias ácido lácticas com importantes aplicações na indústria alimentícia devido a sua capacidade de fermentação. Algumas amostras podem também contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal e para a saúde do hospedeiro quando administradas em concentrações adequadas, caracterizando um potencial probiótico. Dentre os benefícios à saúde, destaca-se a proteção do organismo contra agentes infecciosos devido a mecanismos como: competição por nutrientes e sítios de ligação, antagonismo direto, modulação das respostas imune e inflamatória. Por outro lado, *Listeria monocytogenes* é um patógeno frequentemente veiculado por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados e relacionado à ocorrência de enteropatia, meningoencefalite, aborto e septicemia. 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 *L. monocytogenes*. Pretendeu-se, ainda, elaborar um leite fermentado de cabra potencialmente funcional com B7 e D1, avaliando sua qualidade físico-química, microbiológica e sensorial ao longo de 30 dias de armazenamento a 7°C. Ambas as amostras apresentaram capacidade de inibir *L. monocytogenes in vitro*, além de demonstrar perfil de susceptibilidade desejável a antimicrobianos e resistência desejável a ácidos gástricos e sais biliares. Nos testes *in vivo*, utilizando camundongos convencionais da linhagem BALB/c para determinação de curvas de sobrevida e desenvolvimento ponderal, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as taxas de mortalidade dos grupos controle, B7 e D1 após infecção experimental por *L. monocytogenes*, embora o grupo tratado com D1 tenha apresentado um ganho de peso maior ($p < 0,05$) que os outros grupos. Os leites de cabra fermentados por B7, D1 ambas e *Lactobacillus casei* YA apresentaram parâmetros físico-químicos adequados às legislações e estudos científicos de referência. Os padrões microbiológicos comprovaram a inocuidade do produto e uma população adequada de *Lactobacillus* spp. ($> 10^8$ UFC/g) durante todo o período de 30 dias de estocagem a 7°C. Na análise sensorial, o leite fermentado por D1 mostrou maior aceitação e intenção de compra ($p < 0,05$) pelos provadores, comparado aos demais tratamentos. Esses resultados indicam que D1 apresenta potencial probiótico e poderá ser veiculada para consumo por leite fermentado de cabra.

Palavras chave: *Lactobacillus*, probióticos, BALB/c, *Listeria monocytogenes*, leite fermentado de cabra

ABSTRACT

Lactobacillus spp. are lactic acid bacteria with important implications in food industry due to their fermentation capacities. Some strains may also contribute to the balance of the intestinal microbiota and to the health of the host when administered in an adequate concentration, characterizing a probiotic potential. Among the health benefits, there are protections against infectious agents due to mechanisms like: nutrient competition, competitive exclusion, direct antagonism, immuno and inflammatory modulation. On the other hand, *Listeria monocytogenes* is a pathogen often transmitted by foods of animal origin and is related to the occurrence of enteropathy, meningoenzephalitis, abortion and septicemia. The aim of this survey was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1, isolated from Minas artesanal cheese of the Serra da Canastra, against *L. monocytogenes*. It was still intended to develop a potentially functional fermented goat milk with B7 and D1, and to evaluate the physical-chemical, microbiological and sensorial quality during 30 days of storage at 7 ° C. Both strains demonstrated *in vitro* inhibitory activity against *L. monocytogenes*, besides showing sensitivity to antimicrobials and resistance to gastric acids and bile salts. In the *in vivo* assays, using conventional mice of BALB/c strain to determination of mortality rate and weight gain, no differences were observed ($p>0.05$) between the mortality rate of the control, B7 and D1 groups after experimental infection by *L. monocytogenes*. However, the group treated with D1 showed a higher weight gain ($p<0.05$) than other groups. The goat fermented milks by B7, D1, both and *Lactobacillus casei* YA showed physicochemical parameters adequate to the legislation and scientific studies of reference. Microbiological standards have demonstrated the safety of the product and an adequate population of *Lactobacillus* spp. ($> 10^8$ CFU/g) throughout the 30-day storage period at 7 °C. In the sensory analyses, D1 milk fermented demonstrated higher consumer acceptance and purchase intention ($p<0.05$) than other treatments. These results indicate that D1 showed probiotic potential and may be carried out by fermented goat milk.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, BALB/c, *Listeria monocytogenes*, goat fermented milk

1. INTRODUÇÃO

Segurança alimentar é um dos fatores que mais tem chamado à atenção do mercado consumidor mundial. Segundo o artigo 3º da Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (LOSAN), a segurança alimentar e nutricional é um conceito bastante amplo que aborda o direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos, em quantidade e qualidade adequadas, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base, práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (Brasil, 2006a).

Alguns fatores podem apresentar-se como um risco à integridade dos alimentos que, por sua vez, influenciarão o estado de saúde daqueles que os consomem. Nesse sentido, doenças transmitidas por alimento (DTA) são manifestações clínicas decorrentes do consumo de alimentos e/ou água contaminados por elementos de natureza microbiológica, química ou física. Atualmente, existem cerca de 250 tipos de doenças alimentares sendo as principais delas desencadeadas por micro-organismos patogênicos (Mousa *et al.*, 2016).

Um dos principais fatores de risco associado à ocorrência de DTA, de uma forma geral, é a baixa dose infectante necessária para desencadear o quadro clínico. Como essa dose é menor que a quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos, os consumidores têm uma falsa impressão de inocuidade do produto em virtude da ausência de alterações sensoriais. Diante desse cenário, a prevenção se torna uma etapa fundamental para proteção frente às DTA (Oliveira *et al.*, 2010).

Por outro lado, alimentos também podem exercer um importante papel na promoção da saúde, sendo essa uma grande preocupação de consumidores e pesquisadores nos dias de hoje. Os alimentos funcionais, como são denominados, exercem benefícios específicos à saúde, a partir da redução do risco de diversas doenças e condução do consumidor ao bem estar físico e mental (Abujah *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, tem sido observado um grande avanço no desenvolvimento de produtos com apelo probiótico, prebiótico e simbiótico, que são capazes de exercer uma série de benefícios à saúde, nos quais se incluem: modulação do sistema imune, atividade anticarcinogênica, síntese de vitaminas do complexo B, melhora na digestão da lactose em indivíduos intolerantes e modulação dos níveis de colesterol sérico (Martínéz *et al.*, 2015).

Da mesma forma, o leite caprino, embora pouco explorado no contexto brasileiro, é um alimento que apresenta diversas propriedades benéficas do ponto de vista nutricional, sendo também uma alternativa de consumo aos indivíduos alérgicos ao leite bovino. Além disso, o leite de cabra apresenta componentes de maior digestibilidade, comparado ao leite de outras espécies, resultando na maior absorção de nutrientes (Yadav *et al.*, 2016).

Entretanto, o leite de cabra é alvo de diversas depreciações atribuídas por parte do mercado consumidor em virtude das características sensoriais típicas referentes ao seu sabor e odor. Tal situação é um dos principais fatores que resultam na rejeição do produto, dificultando com que derivados lácteos caprinos conquistem mais espaços nas prateleiras de mercados e, conseqüentemente, na mesa dos consumidores. Por outro lado, o processo de fermentação se apresenta como uma interessante ferramenta capaz de amenizar os sabores e odores indesejáveis, eliminando assim os aspectos depreciativos que são aplicados sobre esse produto.

Dessa forma, o desenvolvimento de produtos como leites fermentados de cabra a partir da adição de culturas bacterianas que apresentam um potencial probiótico se mostra como uma alternativa interessante para introdução de lácteos de origem caprina na mesa dos consumidores brasileiros, ao mesmo tempo em que veicula micro-organismos potencialmente capazes de promoverem benefícios à saúde dos hospedeiros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, contra *Listeria monocytogenes* e elaborar e avaliar leites fermentados de cabra com tais lactobacilos.

2.2. Objetivos específicos

- Confirmar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 a partir da realização de:
 - teste de sensibilidade à antimicrobianos (antibiograma);
 - testes de resistência a sais biliares e ao ácido gástrico artificial;
 - determinar a capacidade de inibição *in vitro* (antagonismo) contra *Listeria monocytogenes*.
- Avaliar o potencial probiótico *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 contra *Listeria monocytogenes*, em camundongos convencionais da linhagem BALB/c, a partir da determinação das taxas de mortalidade e avaliação do desenvolvimento ponderal.
- Elaborar leites fermentados de cabra com os mesmos lactobacilos, submetendo-os a análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, ao longo de 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 7°C.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Queijo Minas artesanal

Queijo Minas artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil. Acredita-se que as técnicas de elaboração tenham sido trazidas pelos colonizadores, devido a semelhanças entre esse processo e o de produção do queijo da Serra da Estrela em Portugal (Meneses, 2006). Porém, outra vertente histórica atribui a origem das técnicas aos imigrantes vindos do arquipélago de Açores, que se estabeleceram em Minas Gerais no século XVIII (Netto, 2011).

A produção de QMA, de forma resumida, é caracterizada pela utilização do leite cru adicionado de soro fermento endógeno, seguido da coagulação pela ação do coalho. O “pingo”, como popularmente é conhecido o fermento, é oriundo do soro resultante da produção de queijos do dia anterior, que é coletado e utilizado na elaboração do produto no dia seguinte. Além disso, essa é considerada uma das principais matérias primas determinantes da identidade própria do QMA, visto que sua composição reflete as condições ambientais das quais se origina (Chalita *et al.*, 2009).

O tradicional modo de fazer o QMA remete a uma grande importância cultural, pois as técnicas de produção têm sido passadas de geração a geração como um símbolo da identidade mineira. Além disso, há grande expressividade do ponto de vista econômico, visto que essa atividade está presente em 70% dos municípios de Minas Gerais, sendo uma das principais fontes de renda para famílias inseridas na agricultura familiar. Estima-se que a produção anual de QMA atinja valores aproximados de 30 mil toneladas, englobando 27 mil produtores (Brant *et al.*, 2007; Dores e Ferreira, 2012). Diante desse cenário, a forma de elaboração do QMA foi reconhecida pelo Inventário Nacional de Referências Culturais do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio imaterial (IPHAN, 2008).

Atualmente, sete regiões do estado são legitimamente reconhecidas pelo Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) como produtoras de QMA: Serro, Serra da Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro. Embora alguns registros históricos indiquem que a região da Serra da Canastra tenha uma tradição secular quanto à produção de queijos, apenas em 2004 os municípios que a compõe (Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita, São João Batista do Glória) obtiveram o reconhecimento legal como produtores de QMA, sendo que, atualmente a região conta com 48 produtores cadastrados no IMA (Minas Gerais, 2004; Minas Gerais, 2017).

O QMA também apresenta grande importância do ponto de vista de saúde pública, pois devido ao caráter artesanal de sua produção associado com a utilização do leite cru como principal matéria prima, há um grande risco de veicular patógenos envolvidos com surtos de origem alimentar (Pinto *et al.*, 2011). Porém, bactérias do grupo ácido láctico presentes na forragem oferecida aos animais, na água utilizada nas queijarias, no leite cru, no soro fermento, nos utensílios utilizados durante elaboração do produto e, conseqüentemente, no queijo, podem contribuir para a eliminação desse risco ao longo do processo de maturação devido à capacidade desses micro-organismos antagonizarem o desenvolvimento e a sobrevivência de patógenos (Castro *et al.*, 2016).

3.2. Bactérias ácido-láticas

Bactérias ácido-láticas (BAL) compõem um grupo microbiano que apresenta algumas características em comum dos pontos de vista fisiológico, morfológico e metabólico. Elas são bactérias que se coram como Gram positivo, sendo encontradas nas formas de bastonetes ou cocos, geralmente não móveis, não esporuladas, catalase-negativo e que produzem ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, a partir de fermentação de carboidratos (Poffo e Silva, 2011).

A maioria das BAL são anaeróbias, porém, algumas amostras têm a capacidade de utilizar o oxigênio em seu metabolismo quando expostas a uma condição aeróbia (Sedewitz *et al.*, 1984). De acordo com a temperatura de crescimento, esses micro-organismos também podem ser classificados como mesófilos (26-41°C), tendo como representantes os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e termófilos (42°C), como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* spp. (Jay, 2005).

Treze gêneros bacterianos pertencentes ao filo Firmicutes compõem o grupo das BAL, sendo eles: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay, 2005). Esses micro-organismos estão amplamente difundidos e adaptados ao ambiente, podendo ser isolados do solo, água, plantas (Yanagida *et al.*, 2007; Fhoula *et al.*, 2013) e de alimentos com alto teor nutritivo, como leite e derivados, carnes e produtos cárneos, pescado e grãos (Corsetti *et al.*, 2001; Pringsulaka *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2016). BAL também estão presentes como componentes da microbiota de diferentes mucosas, como nos tratos gastrintestinal, urogenital inferior e respiratório superior e pele de seres humanos e outros animais. Nesses ecossistemas, as BAL exercem influências benéficas contribuindo para a saúde do organismo (Harzallah e Belhadj, 2013).

A principal característica metabólica das BAL é a capacidade de fermentação de glicídios. Esse processo pode ocorrer por duas vias metabólicas distintas: via das pentoses fosfatos e via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). A via das pentoses fosfatos, também chamada de 6-fosfogluconato/fosfocetolase, se caracteriza pela produção de ácidos (lático e acético), etanol e dióxido de carbono a partir da glicose. Devido à síntese de produtos secundários ao ácido lático, essa via também é chamada de heterofermentativa. Na via EMP ou glicolítica há um predomínio na produção do ácido lático ao final do processo, sendo por isso, classificada como via homofermentativa (Salveti *et al.*, 2013; Taskila e Ojamo, 2013). Existem também as BAL classificadas como heterofermentativas facultativas, que são capazes de produzir gases a partir de outros substratos além da glicose, como o gliconato.

A partir desses processos, BAL têm sido amplamente utilizadas na indústria alimentícia para elaboração de produtos fermentados. Dentre os alimentos produzidos a partir da aplicação tecnológica dessas bactérias, destacam-se os produtos cárneos (Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013), os derivados lácteos (Mani-López *et al.*, 2014; Picon *et al.*, 2016) e conservas vegetais (Pan *et al.*, 2017). O uso desses micro-organismos modifica, de forma desejável, as características sensoriais do produto como sabor e textura. Porém, a escolha de diferentes amostras de BAL como fermento influencia diretamente na determinação desses parâmetros, uma vez que os distintos micro-organismos produzem diferentes compostos (Ikeda *et al.*, 2013).

Além dos aspectos tecnológicos e sensoriais, BAL são responsáveis pela inibição do desenvolvimento de outros micro-organismos nos alimentos, incluindo os patógenos. Essa proteção, do ponto de vista da segurança alimentar, se deve a produção de substâncias de caráter inibitório, principalmente o ácido lático (Arqués *et al.*, 2015; Siroli *et al.*, 2015). Em um organismo, algumas amostras de BAL também

podem exercer diversas atividades que contribuem para a melhor saúde do hospedeiro, sendo dessa forma, consideradas probióticos (Choi *et al.*, 2015; Saez-Lara *et al.*, 2015).

3.3. *Lactobacillus* spp.

O gênero *Lactobacillus* é composto por cerca de 224 espécies e 29 subespécies, sendo considerado o mais numeroso dentro do grupo das BAL. Quanto à taxonomia, esses micro-organismos pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e família Lactobacillaceae. Eles são bactérias que se coram como Gram positivo, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, encontradas nas formas de bastonetes ou cocobacilos em ambientes onde há carboidratos disponíveis para seu metabolismo fermentativo, como alimentos e mucosas de animais (Euzéby, 1997; Balashov *et al.*, 2014; Cousin *et al.*, 2015).

Assim como as demais BAL, as espécies de *Lactobacillus* spp. podem ser divididas em três grupos baseados nas características fermentativas (Stiles e Holzapfel, 1997):

- Homofermentativos: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*
- Heterofermentativos obrigatórios: *L. brevis*, *L. bushneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis*
- Heterofermentativos facultativos: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*

Lactobacillus spp. são geralmente reconhecidos como seguros (*generally recognised as safe* - GRAS) por órgãos de pesquisa e saúde pública, como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO), *Food and Drug Administration* (FDA), *Qualified Presumption of Safety* (QPS) e *European Food Safety Authority* (EFSA) (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013). Associado a isso, diversos estudos demonstram a capacidade que amostras de *Lactobacillus* têm em exercer proteção aos organismos hospedeiros (Campo *et al.*, 2014; Savino *et al.*, 2015). Por esses motivos, bactérias desse gênero são utilizadas como probióticos e na produção de alimentos fermentados.

Entre as espécies desse gênero que já apresentaram um potencial probiótico e vem sendo mais estudadas cientificamente, podem ser citadas: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *L. vaginalis* (Meng *et al.*, 2014; Aiba *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2015; Presti *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016; Sañudo *et al.*, 2017).

3.4. Probióticos

3.4.1. Definição

A palavra “probiótico”, do grego, significa “pró-vida”. Na primeira vez que o termo foi utilizado, Lilly e Stillwell (1965) o definiram como uma substância produzida por um micro-organismo capaz de estimular o crescimento de outros micro-organismos. Posteriormente, com avanço nos estudos, surgiram novas definições. Segundo Parker (1974), probióticos poderiam ser caracterizados como

micro-organismos ou substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal. Já Fuller (1989) definia o termo como suplementos alimentares de micro-organismos vivos que beneficiavam o equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro.

Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são micro-organismos vivos que promovem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em concentrações adequadas (FAO/WHO, 2002). Seguindo o conceito, é possível estabelecer que, muito antes do conhecimento científico sobre o tema, probióticos já eram utilizados, mesmo que de forma empírica, para o tratamento de algumas alterações orgânicas.

3.4.2. Histórico

No antigo testamento da Bíblia (Gênesis 18:8) Abraão, que reconhecidamente tinha uma longevidade que o destacava entre os demais indivíduos daquela época, relatou o hábito de ingerir derivados lácteos fermentados. Da mesma forma, manuscritos da antiga medicina hindu, datados de cerca de 6.000 a.C. relatavam os benefícios que o consumo de lácteos fermentados promovia à saúde (Fisberg e Machado, 2015). Por volta de 76 a.C., o historiador romano Plínio também sugeria a ingestão desses produtos para o tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal (Costa e Miglioranza, 2012).

As primeiras evidências científicas sobre o uso de probióticos foram registradas no século XIX. Nesse período, cientistas observaram a ocorrência de efeitos benéficos à saúde em função da ingestão de lácteos fermentados; porém, ainda não sabiam a razão dessa ocorrência. No mesmo período, Louis Pasteur identificou bactérias e leveduras envolvidas com o processo de fermentação, mas esses não foram associados aos aparentes efeitos sobre a saúde dos consumidores (Barnett, 2000).

No início do século seguinte, Henry Tissier isolou *Bifidobacterium* de fezes de recém-nascidos saudáveis e amamentados, e as administrou em recém-nascidos com quadros de diarreia como forma de tratamento (Tissier, 1906), enquanto o microbiologista ucraniano Elie Metchnikoff associou a longevidade de camponeses búlgaros ao hábito de ingerirem leites fermentados, destacando a importância que os lactobacilos presentes nesses produtos exerciam sobre a saúde do hospedeiro, principalmente no trato gastrointestinal (Metchnikoff, 1908).

A partir dessas descobertas, aumentou-se o interesse da comunidade científica em relação aos micro-organismos capazes de prevenir a ocorrência de doenças, dando início a estudos com humanos que mostraram a capacidade que probióticos tinham em exercer efeitos benéficos à saúde gastrointestinal e até mesmo à saúde mental (Rettger e Cheplin, 1922; Kopeloff *et al.*, 1932).

Nas décadas seguintes, enquanto a maior parte dos estudos em microbiologia era centrada na identificação de micro-organismos patogênicos, as pesquisas sobre probióticos focavam-se no entendimento de seus mecanismos de ação e interação com a microbiota intestinal (McFarland, 2000). Os estudos científicos de probióticos começaram a se intensificar a partir do início do século XXI. No ano 2000 foram publicados 176 trabalhos sobre o tema. Em 2014, esse número aumentou cerca de 840%, atingindo a marca de 1476 publicações anuais (McFarland, 2015).

3.4.3. Utilizações

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia, a eficácia na utilização de probióticos depende de dois fatores: a amostra e sua dose (Guarner *et al.*, 2012). Dessa forma, cada micro-organismo isolado deve ser analisado de forma independente, mesmo que um análogo quanto à espécie, por exemplo, já tenha demonstrado certa característica. Além disso, a simples presença do micro-organismo em um produto não é suficiente para classificá-lo como funcional, visto a necessidade de uma dose adequada para promoção do efeito desejável sobre a saúde do consumidor.

De acordo com McFarland (2015), para um probiótico ser classificado como viável, ele deve possuir cinco propriedades específicas: capacidade de sobrevivência no órgão alvo; capacidade de interagir com o organismo do hospedeiro; ter características antipatogênicas; ser de utilização segura; e ser de produção viável. Por outro lado, estudos científicos evidenciam que mesmo células inviáveis de probióticos são capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, resultando na proteção do organismo (Khoder *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016).

O principal uso de probióticos está ligado a desordens ocorridas no trato gastrointestinal. Entre essas utilizações, podem ser citadas a importância desses micro-organismos na prevenção de casos de “diarreia dos viajantes” (DuPont e Ericsson, 1993), e na ocorrência de diarreia concomitante ao uso de antimicrobianos (Johnston *et al.*, 2016).

Da mesma forma, esses micro-organismos têm sido administrados para tratamento de alterações gástricas promovidas por *Helicobacter pylori* não responsivas aos tratamentos convencionais (Pacífico *et al.*, 2014) e em casos de infecções dentais (Bakarcic *et al.*, 2017).

Estudos também demonstraram que probióticos podem exercer um efeito inibitório contra patógenos comumente relacionados a quadro de gastroenterites, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp. e *Bacillus cereus* (Cean *et al.*, 2015; Montijo-Prieto *et al.*, 2015; Srividya *et al.*, 2015; Oliveira, 2016; Pilchová *et al.*, 2016; Ripert *et al.*, 2016; Acurcio *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2017; Sengupta *et al.*, 2017).

Probióticos também têm sido utilizados para tratamento e prevenção de reações alérgicas, nos casos de dermatite atópica (Panduru *et al.*, 2015), alergias respiratórias (Gorissen *et al.*, 2014) e alergias e intolerâncias de origem alimentar (Fiocchi *et al.*, 2016; Roškar *et al.*, 2017). Metabolicamente, os probióticos podem atuar reduzindo os níveis de colesterol (Miremedi *et al.*, 2014), a pressão sanguínea (Lollo *et al.*, 2015) e a glicemia em jejum (Nikbakht *et al.*, 2018), além de demonstrarem propriedades antiobesidade (Arora *et al.*, 2013).

Segundo Kumar e Dhanda (2017), esses micro-organismos podem ainda apresentar atividades anticancerígenas, atuando benéficamente na prevenção e terapia de neoplasias. Essas atividades ocorrem a partir de propriedades anti-proliferativas, anti-inflamatórias e anti-mutagênicas, bem como a indução da apoptose e efeitos antioxidativos. Além disso, muitos micro-organismos são capazes de prevenir a absorção de agentes mutagênicos e diminuir os níveis de agentes carcinogênicos a partir da produção de azoredutase, β -glicuronidade e nitroreductase (Reddy, 1999; Sharifi *et al.*, 2017).

Outros benefícios potenciais à saúde do hospedeiro incluem a prevenção de infecções no sistema geniturinário (Lee *et al.*, 2016; Tachedjian *et al.*, 2017), prevenção de doenças cardíacas (DiRienzo, 2014), produção de vitaminas (Arena *et al.*, 2014) e, até mesmo, alterações comportamentais relacionados ao sistema nervoso central. Diversos estudos têm mostrado como a microbiota presente no

lúmen intestinal pode influenciar o funcionamento do cérebro e prevenir alterações relacionadas ao estresse, ansiedade e depressão (Foster e Neufeld, 2013; Tillisch *et al.*, 2013).

3.4.4. Mecanismos de ação

As BAL que apresentam características probióticas têm um modo de ação bastante diversificado. Esses mecanismos que resultam em benefícios à saúde do hospedeiro podem ser divididos, didaticamente, nas seguintes categorias: produção de substâncias inibidoras, proteção da barreira epitelial e modulação da resposta imune (Lebeer *et al.*, 2008; Oelschlaeger, 2010).

3.4.4.1. Produção de substâncias inibidoras

Durante o metabolismo, as BAL podem produzir uma série de compostos que são capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos, incluindo os patogênicos.

Dentre as substâncias sintetizadas, os ácidos orgânicos, representados pelo ácido acético e principalmente o ácido láctico, são aquelas que desempenham capacidade de inibição com maior intensidade. A redução do pH do meio em decorrência da produção de ácidos além de prevenir o desenvolvimento de agentes patogênicos, também favorece o desenvolvimento de probióticos adaptados a esse tipo de ambiente, como *Lactobacillus* spp. (Garcia, 2006; Lebeer *et al.*, 2008).

Quando um micro-organismo é exposto a essa condição, os ácidos orgânicos não dissociados permeiam a membrana celular por difusão e liberam prótons no meio intracelular. Esse evento resulta no aumento da permeabilidade das membranas e na acidificação do citoplasma, tornando o meio impróprio para a atividade de diversas enzimas bacterianas. Como um mecanismo compensatório, a célula bacteriana aumenta o consumo de adenosina trifosfato (ATP) para bombear o excesso dos prótons, o que contribui ainda mais para a perda de sua viabilidade (Ogawa *et al.*, 2001; Jay, 2005).

Probióticos podem também produzir bacteriocinas, que são peptídeos ou pequenas proteínas sintetizados nos ribossomos. Essas substâncias apresentam uma atividade antagonista contra outros micro-organismos, ao mesmo tempo em que o produtor detém uma imunidade específica ao composto (Cotter *et al.*, 2005). Bacteriocinas formam um grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos, podendo ser classificadas em diferentes classes de acordo com seus mecanismos de ação, estruturas primárias, massas molares, propriedades bioquímicas e características genéticas, conforme demonstrado na tabela 1 (Mokoena, 2017). Dentre as bacteriocinas, a nisina é a substância mais estudada cientificamente, sendo utilizada de forma regulamentada como conservante de produtos de indústrias alimentícias em cerca de 50 países (Gharsallaoui *et al.*, 2016; Champion *et al.*, 2017).

Tabela 1: Classes e propriedades de bacteriocinas produzidas por probióticos

Classe	Propriedades	Massa	Exemplos	Amostras produtoras
I	Contém um único aminoácido: lantionina ou metilantionina	<5 kDa	Nisina Lactocina Mersacidina	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
IIa	Estabilidade térmica, peptídeos não modificados catiônicos e hidrofóbicos	<10 kDa	Pediocina PA1 Sakacina A Leucocina A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Leuconostoc gelidum</i>
IIb	Sinergia de dois peptídeos catiônicos complementares	<10 kDa	Lactococina G Plantaricina A Enterocina X	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Enterococcus faecium</i>
IIc	Altera permeabilidade de membranas e a formação de paredes celulares	<10 kDa	Acidocina B Enterocina P Reuterina 6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>
III	Grandes moléculas com instabilidade térmica	>30 kDa	Lisostafina Enterolisina A Helveticina J	<i>Staphylococcus simulans</i> * <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>

Adaptado de: Mokoena (2017)

* bactéria sem apelo probiótico

De uma forma geral, os mecanismos de ação das bacteriocinas são baseados na forte tendência desses compostos em interagir com lipídios aniônicos presentes, de forma mais abundante, nas membranas de bactérias Gram positivo. Essas ligações resultam na formação de poros e aumento da permeabilidade das membranas celulares bacterianas (Moll *et al.*, 1999).

Em um menor grau de importância, outros compostos de caráter antagonista também são produzidos durante o metabolismo de probióticos. Entre eles, podem ser citados:

- Peróxido de hidrogênio: um dos principais mecanismos de defesa promovidos por *Lactobacillus* spp. presentes na mucosa do trato urogenital (Mitchell *et al.*, 2015). O peróxido de hidrogênio atua tornando o ambiente anaeróbico, além de ser letal às bactérias ao inativar biomoléculas essenciais para a reação com o ânion superóxido. Esse composto também é capaz de oxidar o tiocianato do sistema lactoperoxidase-tiocianato. Tais mecanismos resultam em acúmulo de radicais livres de oxigênio que são tóxicos às células (Fernandes *et al.*, 1987).
- Dióxido de carbono: torna o ambiente anaeróbico e com pH mais baixo, além de inibir a descarboxilação enzimática e levar à ruptura da membrana celular devido ao acúmulo observado na bicamada lipídica (Mishra e Lambert, 1996).
- Diacetil e acetaldeído: diacetil interfere na utilização da arginina pelas bactérias a partir do desencadeamento de uma reação com uma proteína de ligação a esse aminoácido. Já o acetaldeído é um composto formado durante o metabolismo de carboidratos, que além de ser responsável por características sensoriais em produtos fermentados, também é capaz de inibir o desenvolvimento de patógenos (Naidu *et al.*, 1999; Nosova *et al.*, 2000).

3.4.4.2. Proteção da barreira epitelial

Um dos mecanismos exercidos por probióticos envolvidos com a proteção epitelial é a exclusão competitiva. Nesse processo, um micro-organismo é impedido de colonizar um determinado ambiente devido à presença de outros micro-organismos mais adaptados e previamente estabelecidos (Ojala *et al.*, 2014). A adesão de patógenos em superfícies de mucosas é considerada um dos principais fatores de risco relacionados à ocorrência de infecções. Baseados nisso, trabalhos científicos mostraram que quando as mucosas estão colonizadas por probióticos, há uma menor possibilidade de haver adesões por micro-organismos patogênicos (Dicks *et al.*, 2015).

Da mesma forma, a presença de probióticos no lúmen intestinal desempenha um importante papel na competição por nutrientes. Uma vez consumido por um micro-organismo, os nutrientes tornam-se indisponíveis para que patógenos os utilizem para sua manutenção e desenvolvimento (Verschuere *et al.*, 2000; Candela *et al.*, 2008).

No epitélio, probióticos podem ainda aumentar a expressão de células caliciformes que são responsáveis pela secreção de muco. A camada de muco é composta por glicoproteínas insolúveis em água (mucinas), lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular, que desempenham efeitos bactericidas (Mack *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 2013). Associado a isso, as mucinas tornam o ambiente mais favorável para que probióticos residam e possam promover contato com receptores (Lebeer *et al.*, 2010).

A co-agregação também é um mecanismo utilizado por probióticos que impede a ligação de agentes patogênicos à superfície intestinal. A partir da afinidade entre proteínas de superfícies celulares, probióticos se fixam em outros micro-organismos, impedindo que, fisicamente, eles tenham um contato direto com a mucosa. Dessa forma, os patógenos são eliminados pelo trato gastrointestinal sem realizar seus mecanismos invasivos (Garriga *et al.*, 2014; Aiba *et al.*, 2017).

3.4.4.3. Modulação da resposta imune do hospedeiro

A imunomodulação desencadeada por probióticos pode ocorrer por vários mecanismos, como a ativação de macrófagos, proliferação de células T e aumento da produção de imunoglobulinas e citocinas.

O principal mecanismo de imunomodulação envolve o transporte transepitelial dos probióticos, ou de seus fatores solúveis, a partir de células M presentes nas placas de Peyer do intestino. Ao atingirem o tecido linfóide, esses micro-organismos ou seus fatores podem estimular a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos (CAP), principalmente as células dendríticas e os macrófagos. Probióticos podem ainda interagir diretamente com as células dendríticas quando ramificações dessas atravessam o epitélio intestinal (Hart *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2016).

Células como macrófagos, monócitos, células dendríticas, células B, células T e as células epiteliais intestinais expressam receptores do tipo *Toll*, que são responsáveis pelo reconhecimento de probióticos como antígenos, resultando em induções de sinais que levam a produção de citocinas (IL-1, IL-6, TNF α), quimiocinas e fatores citoprotetores (Kivit *et al.*, 2014).

Ao internalizar probióticos e seus fatores, CAP degradam antígenos a peptídeos que induzem sua maturação. Dessa forma, CAP expressam moléculas coestimuladoras (CD 80 e CD 86) e produzem citocinas que vão resultar na diferenciação de células T (T0) em células T auxiliaadoras (Th) ou células

T regulatórias (Treg), iniciando uma resposta imune adaptativa específica ao antígeno. As subpopulações de células T diferenciadas dependem do tipo de citocinas produzidas pelas CAP após o contato com o antígeno. A produção de IL-12 e IFN γ promovem a diferenciação em Th1, enquanto que IL-4 e IL-2 levam ao aumento da população de Th2. Por outro lado, TGF β e IL-6 resultam na diferenciação em Th17, e TGF β e IL-12 na diferenciação em Treg. O estímulo à secreção de IL-10 também pode levar a diferenciação em Th1, Th2, Th17 e Treg. Linfócitos T citotóxicos também são ativados e atuam na resposta imune pela indução do processo de fagocitose. Citocinas e células T também migram pela corrente sanguínea até o fígado e baço, onde participam da regulação das respostas imunes desses órgãos (Fong *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2016).

3.5. *Listeria monocytogenes*

3.5.1. Características do agente

O gênero *Listeria* pertence à classe Bacilli, ordem Bacillales, família Listeriaceae e apresenta seis espécies: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* e *L. monocytogenes*. Dentre as espécies já identificadas, apenas *L. monocytogenes* é considerada patogênica, embora alguns relatos indiquem a ocorrência de infecções ocasionais causadas por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* (Garrity *et al.*, 2005; Chambel *et al.*, 2007; Rocourt e Buchrieser, 2007).

Listeria spp. são bastonetes que se coram como Gram positivo, não formadores de esporos ou cápsulas, anaeróbios facultativos e móveis devido a presença de flagelos peritríquios. Essas bactérias se desenvolvem em uma ampla faixa de temperatura, que varia de -0,4 a 50°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C. Além disso, elas conseguem se multiplicar em pH de 5,6 a 9,6, embora alguns estudos demonstrem crescimento em pH abaixo de 4,0. Quanto à concentração de cloreto de sódio do meio, *Listeria* spp. tolera altos teores (10 a 12%) e sobrevive até mesmo em 25,5% desse composto. A atividade de água ótima é maior que 0,97, e a mínima varia de 0,90 a 0,93 (Lou e You Sef, 1999; Donnelly, 2001; Swaminathan, 2001; Bille e Rocourt, 2013; Melo *et al.*, 2015).

3.5.2. Listeriose e sua importância epidemiológica

A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode ocasionar uma doença chamada listeriose, que, baseada na manifestação clínica, pode ser dividida nas formas invasiva e não invasiva. A listeriose invasiva é considerada mais grave, com uma taxa de mortalidade que varia de 20 a 30% e acomete principalmente indivíduos debilitados como pacientes imunocomprometidos, submetidos a longos tratamentos (como hemodiálises e quimioterapias), idosos, gestantes e recém-nascidos. Em casos mais graves, essa forma pode levar ao desenvolvimento de aborto, meningite, meningoencefalite, encefalite e septicemia. Por outro lado, a forma não invasiva provoca alterações brandas que geralmente não levam ao óbito, como gastroenterites, febre, vômitos, dor abdominal e diarreia. Em bovinos, ainda é relatado que raramente esse patógeno pode levar ao desenvolvimento de mastite clínica e subclínica (Farber e Peterkin, 1991; Donnelly, 2001; Swaminathan, 2001; Carrique-Mas *et al.*, 2003; Gahan e Hill, 2005; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007; Ryser, 2011).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas e a dose infectante de *L. monocytogenes* capaz de desenvolver a doença tem sido relatada por volta de 10^3 e 10^6 UFC/g ou mL, embora alguns estudos demonstrem que concentrações menores também possam levar a quadros clínicos (Dalton *et al.*, 1997; Mead *et al.*, 1999).

Já foram identificados 13 sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7); porém, a maioria das infecções em humanos são causadas pelos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, sendo os dois primeiros relacionados a casos esporádicos e o último associado à ocorrência de surtos (Wiedmann, 2002; Liu, 2006; Thévenot *et al.*, 2006; Cartwright *et al.*, 2013).

L. monocytogenes é capaz de sobreviver longos períodos em condições ambientais adversas, uma vez que possui a capacidade de se aderir a superfícies e produzir biofilmes, o que contribui para sua resistência frente a tratamentos com produtos desinfetantes. Devido a essa característica, o agente já foi isolado em indústrias de processamento de alimentos, principalmente as de produtos lácteos (Gianfranceschi *et al.*, 2003; Lundén *et al.*, 2003; Kabuki *et al.*, 2004; Kells e Gilmour, 2004; Wagner *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2015). A incidência do patógeno nesses produtos pode chegar a valores elevados como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Incidência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos

Estudo	País	Produto	Incidência (%)
Silva <i>et al.</i> (1998)	Brasil	Queijo Minas frescal	41,1
Nørrung <i>et al.</i> (1999)	Dinamarca	Queijo macio	19
Branco <i>et al.</i> (2003)	Brasil	Queijo de coalho	19
Pintado <i>et al.</i> (2004)	Portugal	Queijo macio	46
Kis <i>et al.</i> (2006)	Hungria	Leite e produtos lácteos	3,5
Abrahão <i>et al.</i> (2008)	Brasil	Queijos macios/semi-macios	6,7

Adaptado de Borges *et al.* (2009)

Além de laticínios, *L. monocytogenes* também já foi isolada em indústrias processadoras de carne, em frutas e vegetais, pescado e frutos do mar (Martín *et al.*, 2014; Sant’ana *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015; Abdollahzadeh *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos, considerado o país com sistema de notificação de casos e surtos de origem alimentar mais eficaz, dados da ferramenta online ‘Food Tool’ do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), demonstram a importância do patógeno como agente etiológico de DTA, principalmente quanto a sua veiculação por meio de derivados lácteos, como queijos frescos.

De 1998 a 2016, o ‘Food Tool’ registrou 68 surtos alimentares envolvendo *L. monocytogenes*, conforme demonstrado na tabela 3. Nesses surtos, foi contabilizada a ocorrência de 860 indivíduos acometidos com 615 hospitalizações (71,5%) e 132 mortes (15,3%), destacando a importância que o patógeno tem como uma das principais causas de óbitos entre os agentes envolvidos com DTA.

Tabela 3: Distribuição de casos de listeriose de 1998 a 2016 nos EUA

Ano	Surtos	Doentes	Hospitalizações	Mortes
1998	2	105	101	21
1999	5	28	7	2
2000	2	41	29	7
2001	2	84	1	0
2002	1	54	0	8
2003	2	15	12	1
2004	0	0	0	0
2005	4	34	34	1
2006	4	10	3	2
2007	1	5	5	3
2008	3	33	29	3
2009	3	32	15	0
2010	6	66	61	13
2011	5	168	150	35
2012	4	36	34	5
2013	5	29	25	5
2014	10	57	53	14
2015	2	21	19	1
2016	2	15	14	1
TOTAL	68	860	615 (71,5%)	132 (15,3%)

Adaptado de: CDC (2017)

3.5.3. Antagonismo de BAL contra *L. monocytogenes*

Diversos estudos científicos têm comprovado a capacidade de algumas amostras de probióticos em inibir o desenvolvimento e antagonizar a atividade de *L. monocytogenes*.

Garriga *et al.* (2014) observaram que *Lactobacillus sakei* isolado de embutidos cárneos fermentados era capaz de inibir a adesão do patógeno em células do epitélio intestinal *in vitro*. Além disso, esse mesmo micro-organismo tinha a capacidade de produzir sakacina K, uma bacteriocina que exerce atividade anti-*Listeria* durante a fermentação de produtos cárneos. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Bendali *et al.* (2014) e Pilchová *et al.* (2016) com a utilização de *Lactobacillus paracasei* e *Carnobacterium* spp., respectivamente. Jesus *et al.* (2016), ao compararem queijos *cottage* produzidos com e sem probióticos e inoculados com *L. monocytogenes*, observaram ausência na detecção do patógeno nos produtos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*.

Alguns estudos também têm demonstrado a capacidade de probióticos exercerem efeitos protetores *in vivo*. No trabalho de Van Zyl *et al.* (2016), camundongos foram tratados com probióticos por seis dias via gavagem intragástrica e em seguida foram infectados experimentalmente, via oral, por amostras bioluminescentes de *L. monocytogenes*. No grupo de animais tratados com *Lactobacillus plantarum*, não foi observada a presença do patógeno no intestino delgado após 4 horas de infecção e no intestino grosso após 2 horas. No grupo tratado com *Enterococcus mundtii*, não foram registradas células bioluminescentes em nenhum momento, sugerindo que o crescimento do micro-organismo havia sido suprimido.

No trabalho de Lukic *et al.* (2017), foi demonstrada a capacidade de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus salivarius* em modular a resposta imune de ratos, sendo também capazes de diminuir as contagens de *L. monocytogenes* nos baços dos animais infectados pela via oral e melhorar as condições clínicas pós-infecção. Da mesma forma, Santos *et al.* (2011) mostraram que *Lactobacillus delbrueckii* promove uma imunomodulação a partir do aumento da produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ em camundongos *germ-*

free, resultando na proteção dos animais contra mortes causadas pela infecção por *L. monocytogenes*. Bambirra *et al.* (2007) também mostraram que *L. sakei* pode exercer efeitos protetores à saúde de camundongos *germ-free*, quando administrados por gavagem, frente à infecção via oral por *L. monocytogenes*.

Estudos científicos demonstraram também que durante o curso da listeriose em camundongos, é evidenciada uma perda significativa de peso dos animais (Maury *et al.*, 2016). Porém, a administração de *Lactobacillus* spp. tem se mostrado como uma potencial opção para minimizar o efeito do baixo desenvolvimento ponderal decorrente do desafio por enteropatógenos (Acurico *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). A melhora da condição física em virtude do tratamento pode ser um fator que contribui para uma maior resistência dos camundongos frente ao quadro clínico característicos das gastroenterites.

Embora tenha sido mostrados estudos *in vivo* destacando a relação entre probióticos e *L. monocytogenes*, alguns pesquisadores também encontraram dificuldades em estabelecer um modelo murino de listeriose. A obtenção de um modelo *in vivo* alternativo para reprodução da doença apresenta como grande desafio, o restrito tropismo entre esse patógeno e receptores epiteliais de seus hospedeiros (Lecuit e Cossart, 2002). Diante disso, se faz necessário e importante realizar estudos de comportamento clínico de camundongos após o desafio por *L. monocytogenes*, em diferentes vias de inoculação e dosagens, para determinar um modelo de indução da doença de uma forma mais adequada.

3.6. Leites fermentados

Embora não exista uma legislação específica para regulamentar a produção de leites fermentados de cabra, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define os leites fermentados de vaca como “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” (Brasil, 2007). Baseado nisso, uma série de produtos podem ser classificados como leites fermentados, como iogurte, leite cultivado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada.

Historicamente, hieróglifos encontrados na civilização egípcia já retratavam a prática de produzir leites fermentados. Da mesma forma, registros mostram que nômades tibetanos há cerca de 12.000 anos submetiam o leite de iaque (*Bos grunniens*) à fermentação como forma de conservar o produto por um maior período de tempo (Guo *et al.*, 2014). Mesmo em passagens do antigo testamento da Bíblia e em registros do antigo império romano, há evidências da adoção da fermentação como um tratamento aplicado ao leite (Costa e Miglioranza, 2012). Acredita-se que a incorporação de produtos lácteos na dieta humana tenha se estabelecido por volta de 10.000 – 5.000 a.C., pois esse período coincide com a época de domesticação de animais produtores de leite (Moreno *et al.*, 2013).

Porém, apenas no século XIX, em pesquisas de Louis Pasteur, micro-organismos foram isolados desses produtos e vinculados ao processo de fermentação (Barnett, 2000). A partir desse período, iniciaram-se os vários estudos focados no processo de fermentação do leite e seus potenciais benefícios à saúde dos consumidores (McFarland, 2015).

Primordialmente, a fermentação do leite foi utilizada como estratégia para conservar o produto por um maior período de tempo. Associado a isso, observou-se que esse processo também era responsável pelo desenvolvimento de características sensoriais desejáveis e aumento do valor nutricional do produto

(Buttriss, 1997; El-Ghaish *et al.*, 2011; Trivedi *et al.*, 2014). Para a indústria de laticínios, a fermentação é uma ferramenta muito importante para agregar valor ao leite, pois a partir da atividade dos micro-organismos há o desenvolvimento de aroma e sabor desejáveis.

Dessa forma, leites fermentados são produtos interessantes do ponto de vista nutricional, ao mesmo tempo em que exercem benefícios à saúde do consumidor, uma vez que esses têm sido um dos principais veículos de probióticos disponíveis comercialmente (Farvin *et al.*, 2010).

3.6.1. Leite fermentado de cabra

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui um rebanho efetivo de aproximadamente 9,8 milhões de caprinos, sendo que cerca de 92% desses animais estão situados na região nordeste do país, conforme demonstrado na tabela 4 (IBGE, 2016).

Tabela 4: Distribuição do rebanho caprino no Brasil em 2016

Região	Número de animais
Norte	152.611
Nordeste	9.092.724
Sudeste	171.749
Sul	270.458
Centro-Oeste	92.991
TOTAL	9.780.533

Adaptado de IBGE (2016)

Minas Gerais ocupa a 10^a posição entre os estados produtores de caprinos, com um rebanho de 81.306 cabeças concentrados principalmente nas regiões do Norte de Minas e Zona da Mata. A predominância da caprinocultura nessas regiões demonstra uma importância dos animais na subsistência da população, que em sua maioria é carente e encontra nos caprinos a principal fonte de renda e proteína de origem animal (Guimarães, 2006).

Embora a produção de leite fermentado de cabra ainda não tenha apresentado grande desenvolvimento comercial, esse produto possui algumas características que o tornam interessante do ponto de vista nutricional, como melhor digestibilidade comparado ao produto análogo de vaca (Slačanac *et al.*, 2010).

Quanto às propriedades nutricionais, no estudo de El-Hatmi *et al.* (2015) foi observado que, comparado ao leite de diversas espécies (primatas, bovinos e camelídeos), o leite de cabra apresentava maior teor de sólidos totais. Moreno-Fernandéz *et al.* (2016), ao compararem a composição de macro e micronutrientes de produtos lácteos fermentados produzidos com leites de cabra e vaca, observaram um maior valor nutricional no lácteo caprino. Esse produto também apresenta outras peculiaridades que o destaca entre os leites das demais espécies. Dentre essas características pode ser citada a melhor digestibilidade de seus componentes, sendo um alimento alternativo à pacientes com síndromes de má absorção e neoplasias, além de ser uma opção de substituição do leite de vaca por indivíduos que apresentam alergia a esse produto (Yadav *et al.*, 2016).

O leite de cabra tem se mostrado como um potencial veículo de probióticos, a partir da adição ou fermentação do produto por amostras de *Lactobacillus* com tais características, como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus*. Além disso, os leites fermentados de cabra em questão, sensorialmente se apresentaram com altas taxas aceitação entre os provadores (Chen *et al.*, 2015; Shu *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016; Shu *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Os resultados citados sugerem que além da possibilidade de veicularem micro-organismos benéficos à saúde dos consumidores, esses leites fermentados também apresentam interessantes perspectivas mercadológicas quanto à produção em escala industrial, pela grande receptividade demonstrada pelo público exposto aos produtos.

Apesar das várias vantagens nutricionais que o leite fermentado de cabra apresenta, esses produtos ainda não são produzidos no Brasil de modo comercial. De uma forma em geral, também é observado um baixo consumo de derivados lácteos caprinos no mercado consumidor brasileiro (Costa *et al.*, 2016). A rejeição por parte dos consumidores muito se deve às características sensoriais bastantes peculiares encontradas nesses produtos. O leite de cabra, comparado ao bovino, apresenta um maior teor de ácidos graxos de cadeias curta e média, principalmente quanto à presença dos ácidos butírico (C4:0), caprótico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e mirístico (C14:0), sendo que, os ácidos caprótico, caprílico e cáprico constituem cerca de 20% do total de ácidos graxos nesse produto (Slačanac *et al.*, 2010). A presença desses compostos é responsável pelo desenvolvimento de sabor e odor específicos do leite de cabra, considerados indesejáveis por parte dos consumidores. Além disso, atividade de lipases de origem bacteriana, como demonstrada por *L. rhamnosus*, pode resultar na liberação de ácidos graxos presentes na posição sn-3 da molécula de triglicerídeos, aumentando a concentração dessas substâncias no leite (Jia *et al.* 2016).

Por outro lado, a fermentação é um processo que tem demonstrado um efeito desejável quanto à redução da percepção dessas características sensoriais, sendo dessa forma, uma ferramenta interessante para introdução dos produtos lácteos de origem caprina no mercado consumidor (Slačanac *et al.*, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos utilizados

4.1.1. Amostras de Bactérias Ácido Lácticas

As espécies de *Lactobacillus* utilizadas no trabalho foram previamente isoladas de queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra – Minas Gerais e caracterizadas ao nível molecular por Resende *et al.* (2011). Para a identificação das bactérias, foi utilizado o método de PCR ARDRA 16S-23S rDNA, seguindo a metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997).

O potencial probiótico *in vitro* das espécies *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 foi testado no estudo de Costa *et al.* (2013). Para essa finalidade, as amostras foram submetidas a testes de sensibilidade ao suco gástrico e sais biliares, susceptibilidade a antimicrobianos e antagonismo contra micro-organismos

patogênicos. Todas as análises citadas acima foram realizadas também nesse trabalho para certificar a manutenção de tais características ao longo do período de congelamento.

Além de B7 e D1 demonstrarem um potencial probiótico *in vitro* satisfatório no estudo de Costa *et al.* (2013), a administração desses micro-organismos em camundongos resultou em efeito protetor *in vivo* contra infecções causadas por *Escherichia coli* enteroinvasiva e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (Oliveira, 2016; Acurcio *et al.*, 2017).

A conservação de ambos os lactobacilos foi realizada por meio de congelamento a -20°C em criotubos contendo caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco[®], Detroit, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. As ativações e repiques foram feitos em caldo MRS, a 37°C, em aerobiose e em intervalos de 24 horas.

4.1.2. Amostra de *Listeria monocytogenes*

O patógeno revelador da atividade antagonista utilizado foi *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 gentilmente doada pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A identificação da cultura foi realizada por meio de espectrometria de massa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF), conforme metodologia descrita por Singhal *et al.* (2015).

A conservação da amostra foi realizada por meio de congelamento a -20°C em criotubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco[®], Detroit, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. As ativações e repiques foram feitos em caldo BHI, a 37°C, em aerobiose e em intervalos de 24 horas. Em todas as etapas da pesquisa em que o patógeno foi utilizado, analisou-se a pureza da cultura a partir de seu estriamento em *Agar Selective Listeria* (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra).

4.2. Avaliação do potencial probiótico *in vitro*

4.2.1. Resistência a antimicrobianos

Foi utilizada a técnica adaptada de antibiograma (Charteris *et al.*, 1998a) para avaliação da susceptibilidade das BAL aos antimicrobianos de diferentes grupos farmacológicos. As amostras de lactobacilos inicialmente foram cultivadas em caldo MRS (Difco[®]) a 37°C, por 24h e sob aerobiose. Em seguida, os micro-organismos foram coletados por alças de transferência e estriados em placas de Petri contendo ágar MRS (Difco[®]). Na sequência, as placas foram incubadas a 37°C, durante 24h, sob aerobiose.

Após a incubação, as colônias foram transferidas, com uso de alças, para tubos de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina (NaCl) 0,9% até que a turvação atingisse 0,5 na escala de McFarland, o que equivale a uma concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL. Em seguida, *swabs* estéreis foram imersos na salina para que o inóculo fosse coletado e distribuído por toda extensão de placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo ágar MRS (Difco[®]).

Após a secagem da salina contendo o inóculo, foram distribuídos dez discos contendo doses conhecidas de antimicrobianos (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) sobre o ágar MRS (Difco[®]) de cada placa. As drogas utilizadas, suas abreviações, concentrações e grupos farmacológicos podem ser observados na tabela 5:

Tabela 5: Discos de antimicrobianos utilizados no antibiograma

Antimicrobiano	Concentração	Grupo	Abreviação
Ampicilina	10 µg	β-lactâmicos: penicilínicos	AMP10
Cefoxitina	30 µg	β-lactâmicos: Cefalosporina de 2 ^a geração	CFO30
Ceftriaxona	30 µg	β-lactâmicos: Cefalosporina de 3 ^a geração	CRO30
Ciprofloxacina	5 µg	Quinolonas de 3 ^a geração	CIP5
Cloranfenicol	30 µg	Anfenicóis	CLO30
Estreptomicina	10 µg	Aminoglicosídeos	EST10
Gentamicina	10 µg	Aminoglicosídeos	GEN10
Penicilina	10 µg	β-lactâmicos: penicilínicos	PEN10
Tetraciclina	30 µg	Tetraciclinas	TET30
Vancomicina	30 µg	Glicopeptídeos	VAN30

Por fim, as placas foram incubadas a 37°C, por 48 h em aerobiose. Os halos de inibição ao redor dos discos formados após esse período foram medidos por paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper[®] (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil). Todo o procedimento descrito foi realizado em duplicata e em três repetições. A classificação das amostras como resistentes, moderadamente sensíveis ou sensíveis aos antimicrobianos foi feita de acordo com o padrão proposto por Charteris *et al.* (1998a), conforme observado na tabela 6.

Tabela 6: Níveis de sensibilidade de *Lactobacillus* spp. à antimicrobianos de acordo com as médias dos diâmetros dos halos de inibição (mm) no teste de antibiograma

Antimicrobiano	Concentração	Nível de susceptibilidade (mm)		
		Resistente	Moderadamente sensível	Sensível
Ampicilina	10 µg	≤12	13-15	≥16
Cefoxitina	30 µg	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona	30 µg	≤13	14-20	≥21
Ciprofloxacina	5 µg	≤13	14-18	≥19
Cloranfenicol	30 µg	≤13	14-17	≥18
Estreptomicina	10 µg	≤11	12-14	≥15
Gentamicina	10 µg	≤12	-	≥13
Penicilina	10 µg	≤19	20-27	≥28
Tetraciclina	30 µg	≤14	15-18	≥19
Vancomicina	30 µg	≤14	15-16	≥17

Fonte: Charteris *et al.* (1998a)

4.2.2. Resistência *in vitro* ao ácido gástrico artificial

Para avaliação da resistência de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 ao suco gástrico, foi realizada a técnica adaptada descrita por Neumann (1991) e Silva *et al.* (2013). O método foi realizado em duplicata e com três repetições.

As culturas ativadas foram transferidas para dois microtubos do tipo *Eppendorf*[®], sendo uma dessas culturas diluídas dez vezes em solução salina 0,9% com pH 7,0 (controle) e a outra em suco gástrico artificial constituído de salina 0,9% com pH 2,0 e pepsina na concentração de 3 g/L. Na sequência, os microtubos foram incubados a 37°C por 30 minutos, seguido de centrifugação a 13.000 G por 1 minuto. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante da centrifugação foi suspenso em caldo MRS (Difco[®]).

Na etapa seguinte, 200 µL das soluções controle e tratada com suco gástrico foram distribuídas em microplacas de 96 poços. A avaliação da viabilidade celular foi feita pela incubação da microplaca em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System 47 SpectraMax 340[®] - Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) a 37°C por 12 horas.

A absorbância do cultivo foi determinada a partir da leitura de OD_{620nm} a cada 30 minutos, sendo que a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando a fórmula $(1-SG/CT) \times 100$ utilizando o programa Graphpad Prism 7.0. Na equação anterior, SG e CT correspondem às áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente.

A interpretação dos resultados foi realizada baseando-se no percentual de inibição das culturas, segundo a avaliação proposta por Acurcio *et al.* (2014): <40% = tolerantes; 40-80% = moderadamente tolerantes; e 80% = sensíveis.

4.2.3. Resistência *in vitro* aos sais biliares

As amostras de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 foram submetidas à análise de resistência *in vitro* aos sais biliares pela metodologia adaptada descrita nos trabalhos de Walker e Gilliland (1993) e Silva *et al.* (2013). O método foi realizado em duplicata e com três repetições.

Ambas as culturas foram distribuídas em microtubos do tipo *Eppendorf*[®] a uma concentração de 2% (v/v) em caldo MRS (Difco). Na sequência, 100µL do inóculo foi pipetado para uma microplaca com 96 poços contendo 100µL de caldo MRS (Difco[®]) e 100µL de caldo MRS (Difco[®]) com sais biliares (Oxgall[®]) a 0,3% (p/v), respectivamente. Durante a incubação da microplaca a 37°C por 12h em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System 47 SpectraMax 340[®] - Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), a leitura da absorbância (OD_{620nm}) foi realizada a cada 30 minutos.

A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi estimada a partir da fórmula $(1-SB/CT) \times 100$ utilizada no *software* Graphpad Prism 7.0. Na equação, SB e CT representam, respectivamente, as áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e não (controle). A interpretação dos resultados foi realizada segundo a avaliação proposta por Acurcio *et al.* (2014), na qual os autores também se basearam na porcentagem de inibição do crescimento das amostras: <40% = tolerantes; 40-80% = moderadamente tolerantes; e 80% = sensíveis.

4.2.4. Teste de antagonismo *in vitro* – “Spot on the lawn”

A relação de antagonismo entre os micro-organismos produtores (*L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1) e reveladores (*L. monocytogenes*) foi avaliada por meio da técnica *spot on the lawn* descrita por Tagg *et al.* (1976), em duplicata e em três repetições.

A primeira etapa da técnica consiste na formação do *spot*. Para isso, 5µL das culturas dos lactobacilos, ativada duas vezes em caldo MRS, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo ágar MRS (Difco®). Após incubação das placas a 37°C sob aerobiose por 48h, as bactérias produtoras foram eliminadas dentro de fluxo laminar a partir da adição de 1 mL de clorofórmio nas tampas das placas, que permaneceram invertidas por 30 minutos. Em seguida, as placas foram expostas à luz ultravioleta por 30 minutos para garantir a eliminação das produtoras. Após eliminação dos lactobacilos, 10µL da cultura ativada de *L. monocytogenes* foram transferidos para tubos contendo 3,5mL de BHI (Difco®) no estado semissólido (0,75% de ágar bacteriológico – Difco®). Por fim, o conteúdo do tubo foi homogeneizado e vertido sobre placas contendo o *spot* inativado. Depois da solidificação do ágar BHI semissólido, as placas foram novamente incubadas em estufas a 37°C, por 48h, em aerobiose.

Decorrido o período de incubação, avaliou-se a formação de halos ao redor dos *spots*, que representam a inibição do crescimento do patógeno pelas substâncias produzidas pelos *Lactobacillus* durante o crescimento do *spot*. A leitura dos halos foi feita por meio da mensuração dos diâmetros utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper® (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil).

Além da avaliação do antagonismo das BAL isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra-MG contra *L. monocytogenes*, o mesmo procedimento foi realizado a fim de testar o antagonismo entre *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1. Essa etapa teve como intuito avaliar se a utilização das bactérias em conjunto durante a fermentação de leites seria viável ou se uma supriria a atividade da outra.

A fim de estabelecer um padrão comparativo, a cultura de *L. monocytogenes* também foi submetida ao teste de antagonismo produzido pelas bactérias listadas na tabela 7, que são comprovadamente conhecidas e utilizadas como probióticos. Dessa forma, foi possível comparar estatisticamente o potencial de inibição *in vitro* contra o patógeno desempenhado pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra-MG com o comportamento exercido por probióticos disponíveis comercialmente.

Tabela 7: Probióticos comerciais utilizados para comparação de antagonismo *in vitro* de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 contra *Listeria monocytogenes*

Micro-organismo	Amostras
<i>Lactobacillus casei</i>	AC
	EL
	IT
	PA
	VI
	YA
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CH
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG

4.3. Teste de proteção *in vivo*

4.3.1. Animais

Setenta camundongos machos da linhagem BALB/c, com quatro semanas de idade, pesando entre 15 e 17g, foram obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas dentro de estante ventilada (Alesco[®], Mont Mor, São Paulo, Brasil), com controle de temperatura (22 ± 1 °C), umidade (60–80%) e ciclo de luz (12 h/ 12 h), onde recebiam água e alimentação (Nuvital[®], Curitiba, Paraná, Brasil) *ad libitum*.

A escolha da linhagem BALB/c foi baseada na maior susceptibilidade desses animais à infecção intragástrica, intravenosa e intraperitoneal por *L. monocytogenes* quando comparada a outras linhagens, como a C57BL/6, segundo pesquisas realizadas anteriormente (Hoelzer *et al.*, 2012; D’Orazio, 2014).

A etapa de experimentação animal foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 80/2015 (Anexo I). Os experimentos com animais foram conduzidos respeitando as normas do “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (Brasil, 2015).

4.3.2. Determinação de modelo de infecção experimental

Para estabelecimento de um modelo murino de infecção experimental por *L. monocytogenes*, foi realizado um ensaio prévio com o objetivo de determinar as doses e a via de inoculação mais adequadas, para reprodução do quadro clínico de listeriose.

Os animais foram divididos em nove grupos com três camundongos cada, sendo desafiados conforme demonstrado na tabela 8. Após a infecção, os animais foram avaliados por 15 dias, observando a ocorrência de morbidade e mortalidade.

Tabela 8: Vias de inoculação e doses de *L. monocytogenes* para estabelecimento de um modelo murino de infecção experimental

Via de inoculação	Volume do inóculo	Doses (UFC)
Oral	100µL	10 ⁹
		10 ⁸
		10 ⁷
Intraperitoneal	100µL	10 ⁷
		10 ⁶
		10 ⁵
Intravenoso	50µL	10 ⁷
		10 ⁶
		10 ⁵

As doses de escolha, baseadas na via de inoculação do patógeno, foram determinadas a partir de informações sobre infecções experimentais em camundongos BALB/c observadas na literatura

científica (Join-Lambert *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005; Puertollano *et al.*, 2008; Campion *et al.*, 2013; D'Orazio, 2014; Quereda *et al.*, 2016).

4.3.3. Curva de sobrevida e desenvolvimento ponderal

A avaliação do efeito protetor *in vivo* foi realizada a partir da determinação do desenvolvimento ponderal e da taxa de mortalidade dos animais após exposição ao patógeno. Para isso, os animais foram divididos em três grupos de 14 camundongos cada, sendo que cada grupo recebeu um tratamento específico por gavagem intragástrica durante quatro semanas:

- Grupo controle: 100µL de salina 0,9%
- Grupo B7: 100µL de inóculo de *L. plantarum* (10⁸ UFC)
- Grupo D1: 100µL de inóculo de *L. rhamnosus* (10⁸ UFC)

No 11º dia de tratamento, todos os animais foram infectados por *L. monocytogenes*, de acordo com a dose e via de inoculação determinados na etapa anterior (10⁶ UFC via intravenosa). Durante todo o período, foi feita a avaliação clínica dos animais, assim como o registro do peso a cada 48 horas e a contabilização de óbitos diariamente. Os dez dias de pré-tratamento com os lactobacilos é um período que tem se mostrado suficiente para observação de uma atividade imunomodulatória de probióticos no organismo do hospedeiro (Gill *et al.* 2000).

4.4. Elaboração de leite fermentado de cabra por *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1

4.4.1. Obtenção e avaliação da qualidade do leite de cabra cru

O leite de cabra foi adquirido por ordenha manual em capril situado no município de Contagem-MG, região metropolitana de Belo Horizonte. Foram realizadas a obtenção de 3 lotes distintos (datas diferentes) de 20 L de leite de conjunto. Amostras foram colhidas em tubos contendo comprimidos de bronopol[®] (para realização de análises de composição química e contagem de células somáticas) e azidiol[®] (para realização de contagem bacteriana total). A determinação da composição química (teores percentuais de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados) e contagem de células somáticas (CCS), foram realizadas, respectivamente, por absorção de radiação infravermelha e citometria de fluxo em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300 (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, EUA). A contagem bacteriana total (CBT) também foi determinada por citometria de fluxo, em equipamento eletrônico BactoCount IBC (Bentley Instruments Inc.) (IDF, 1995; IDF, 2000; Bentley, 2002). Todas as análises supramencionadas foram realizadas no LabUFMG.

Também foi realizado teste de inibidores do crescimento microbiano, uma vez que o leite seria utilizado para produção de leites fermentados por culturas bacterianas. Para tal fim, adotou-se, em triplicata, o método do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), descrito por Neal e Calbert (1955).

4.4.2. Determinação da curva de fermentação das culturas testadas

As culturas utilizadas (*L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1) foram previamente ativadas em 200 mL leite esterilizado (110°C por 10 minutos), adicionado de 8% de sacarose e incubadas a 37°C até a coagulação (cerca de 20 horas). Na sequência, foram adicionados 2,5% (v/v) de cada leite fermentado pelos lactobacilos (B7 e D1) em 500 mL de leite de cabra esterilizados acrescidos com 8% de sacarose. Também se avaliou o comportamento fermentativo das culturas associadas, ao inocular 1,25% (v/v) de B7 e 1,25% (v/v) de D1 em 500 mL leite de cabra esterilizado com 8% de sacarose. Os leites foram mantidos em estufas a 37°C ± 2°C até formação de coágulo, início da sinérese e pH atingindo valores entre 4,5 e 5,0.

A curva de fermentação do leite de cabra foi obtida a partir das determinações do pH, acidez titulável e enumeração de *Lactobacillus* (UFC/g) a cada duas horas a partir do tempo zero (adição dos inóculos) (IDF, 1988; Brasil, 2006). O procedimento foi realizado em três repetições e permitiu a determinação do tempo de fermentação mais adequado para produção de leite fermentado de cabra pelos *Lactobacillus* estudados.

4.4.3. Elaboração do leite fermentado de cabra para os testes de aceitação

Para elaboração dos leites fermentados, utilizaram-se as culturas de *L. plantarum* (B7), *L. rhamnosus* (D1), ambos os lactobacilos em proporção 1:1 (M) e *Lactobacillus casei* (YA) isolado de leite fermentado funcional comercial por Acurcio (2016) para padrão comparativo (controle positivo). Foram produzidos três lotes de leites fermentados composto, cada um, por dois recipientes de 2000 mL (destinado às análises sensoriais com 15 e 30 dias de estocagem a 7°C) e um recipiente de 1000 mL (destinado às análises físico-químicas e microbiológicas com 0, 15 e 30 dias de estocagem a 7 °C) por tratamento.

Inicialmente, os micro-organismos foram ativados em 200 mL leite com 8% de sacarose, esterilizado a 110°C por 10 minutos, sendo incubados a 37°C ± 2°C até coagulação do mesmo. Após essa etapa, 2,5% (v/v) de cada cultura (B7, D1 e YA) foram inoculados nos recipientes de 1000 mL e 2000 mL contendo leite de cabra esterilizado e sacarose a 8%. No caso do leite com cultura mista (M), adicionou-se 1,25% (v/v) de B7 e 1,25% (v/v) de D1.

Após a fermentação, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 7°C em estufa incubadora do tipo “Demanda Bioquímica de Oxigênio” (São Paulo, Brasil), sendo retiradas apenas para realização de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

4.4.4. Análises físico-químicas dos leites fermentados

Para avaliação da qualidade físico-química dos leites fermentados de cabra, foi realizada a coleta de amostras com 0, 15 e 30 dias de estocagem a 7°C para realização das seguintes análises em triplicatas:

- determinação do pH em pHmetro digital (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil)
- determinação da acidez titulável (Brasil, 2006)

- teor percentual de extrato seco total e cinzas pelo método gravimétrico (Brasil, 2006)
- teor percentual de gordura pelo método de Roese-Gottlieb (Brasil, 2006)
- teor percentual de proteínas pelo método de Micro-Kjedahl (Brasil, 2006)
- concentração de ácidos graxos livres (Deeth *et al.*, 1975)

4.4.5. Análises microbiológicas dos leites fermentados

Amostras dos leites fermentados também foram coletadas nos dias 0, 15 e 30 de estocagem a 7°C para avaliação dos parâmetros microbiológicos listados a seguir:

- enumeração de *Lactobacillus* (IDF, 1988)
- pesquisa de bolores e leveduras (Brasil, 2003)
- pesquisa de coliformes a 30°C e 45°C pelo método do número mais provável (Brasil, 2003)
- pesquisa de *Salmonella* spp. (Brasil, 2003)
- pesquisa de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positivo (Brasil, 2003)

4.4.6. Teste de análise sensorial dos leites fermentados

A análise sensorial de aceitação dos leites fermentados foi realizada em três repetições para os dias 15 e 30 de estocagem a 7°C por 70 provadores não treinados e maiores de idade, que tinham interesse e/ou hábito de consumir leite fermentado, de acordo com o procedimento realizado por Viegas *et al.* (2010).

As amostras de leites fermentados foram codificadas com sequências aleatórias de três dígitos e servidas aos provadores, dentro de cabines individuais, em porções de aproximadamente 30 mL em copos de plástico com temperatura máxima de 10°C. Os provadores avaliaram os produtos em uma ficha contendo escala hedônica de cinco pontos, que permitia avaliar o grau de aceitação por parte dos consumidores, identificados entre:

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

A intenção de compra para cada um dos leites fermentados também foi avaliada pelos provadores, conforme demonstrado na ficha de avaliação (Anexo II). 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 III).

4.5. Análises estatísticas

Foi utilizado o *software* Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA) para realização das análises estatísticas.

As médias dos halos de inibição obtidos pela realização do teste de antagonismo *in vitro* “*spot on the lawn*” foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, em nível de significância de 5%.

As curvas de mortalidade dos animais tratados e não tratados com os lactobacilos e desafiados com *L. monocytogenes* foram avaliadas pelo teste Log-Rank (Mantel-Cox), em nível de significância de 5%. O desenvolvimento ponderal dos animais foi analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Sidak, em nível de significância de 5%.

Os parâmetros físico-químicos dos leites fermentados foram submetidos ao Two-way ANOVA e comparados pelo teste de Tukey, em nível de significância de 5%. A mesma análise estatística foi utilizada para avaliação de contagens bacterianas, após a transformação logarítima desses dados. As médias de aceitação dos leites fermentados atribuídos pelos provadores foram avaliadas pelos testes de Tukey (entre os tratamentos) e t (entre os dias de estocagem do produto a 7°C), em nível de significância de 5%. Por fim, a intenção de compra dos provadores foi analisada pelo teste de Fisher, em nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Potencial probiótico *in vitro* de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1

5.1.1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Os resultados do antibiograma, realizado para verificar o perfil de sensibilidade dos *Lactobacillus* spp. à antimicrobianos de diversas bases farmacológicas, podem ser verificados na tabela 9. Conforme mencionado no item 4.2.1. dessa dissertação, segundo a média dos halos de inibição os microorganismos foram classificados como sensível (S), moderadamente sensível (MS) ou resistentes (R), de acordo com os padrões propostos por Charteris *et al.* (1998a).

Tabela 9: Sensibilidade de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 isolados de QMA da Serra da Canastra –MG à antimicrobianos

Antimicrobiano	Concentração µg	Amostra	
		B7	D1
Ampicilina (AMP)	10	S	S
Cefoxitina (CFO)	30	R	R
Ceftriaxona (CRO)	30	MS	S
Ciprofloxacina (CIP)	5	S	S
Cloranfenicol (CLO)	30	S	S
Estreptomicina (EST)	10	R	R
Gentamicina (GEN)	10	R	R
Penicilina (PEN)	10	S	S
Tetraciclina (TET)	30	S	S
Vancomicina (VAN)	30	R	R

De acordo com a média dos diâmetros dos halos de inibição formados, tanto B7 como D1 se demonstraram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, penicilina e tetraciclina, sendo esse resultado compatível com conclusões observadas em outros estudos de sensibilidade de *Lactobacillus* spp. à antimicrobianos (Patel *et al.*, 2012; Halder e Shyamapada, 2016; James *et al.*, 2016). Embora B7 e D1 tenham também mostrado sensibilidade à ciprofloxacina, informações presentes na literatura contrastam com o resultado obtido. Existem indícios de que *Lactobacillus* spp. apresentam resistência a esse composto, devido características intrínsecas relacionadas à estrutura da parede celular, permeabilidade de membranas e mecanismos de efluxo (Nawaz *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Abriouel *et al.*, 2015).

Da mesma forma, relatos na literatura indicam que algumas amostras de lactobacilos apresentam grau de resistência à ceftriaxona, enquanto outras se mostram sensíveis a essa droga (Sharma *et al.*, 2016), assim como apresentado, respectivamente, por B7 e D1.

Por outro lado, de forma similar ao observado em trabalhos científicos (Wong *et al.*, 2015; Halder e Shyamapada, 2016; Sharma *et al.*, 2016), ambas as amostras apresentaram resistência à cefoxitina, estreptomicina, gentamicina e vancomicina.

Vancomicina é considerada um dos últimos antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes. Todavia, diversas pesquisas demonstraram que, não apenas *Lactobacillus* spp., mas as BAL em geral, podem apresentar até 100% de resistência a esse fármaco (Solieri *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2015). Mesmo apresentando tais características, a utilização dessas bactérias como probiótico não apresenta riscos quanto à transferência de genes de resistência a outros micro-organismos, pois se trata de uma resistência intrínseca (Tynkkynen *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2000). Segundo Delcour *et al.* (1999), em muitas espécies de BAL, o aminoácido terminal do pentapeptídeo muramil presente na parede celular, que normalmente é a d-alanina, é substituído por d-lactato ou d-serina, o que impede a ligação da vancomicina e consequentemente seu mecanismo de ação.

Diversas amostras estudadas de *Lactobacillus* spp. também apresentaram uma tolerância a aminoglicosídeos como estreptomicina e gentamicina. O principal motivo dessa resistência se deve a mecanismos relacionados à permeabilidade de membranas, ausência de citocromos que permitiriam a ligação dos antimicrobianos e modificações do fármaco por acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases (Abriouel *et al.*, 2015). Devirgiliis *et al.* (2013) também destacaram a importância dos genes *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)* e *aph(3')-IIIa* na resistência intrínseca dessas bactérias aos aminoglicosídeos. Entretanto, esses genes também podem ser encontrados em plasmídeos e

transposons, sendo um fator de risco para transferência da resistência a outros micro-organismos (Abriouel *et al.*, 2015).

Embora não haja evidências de que *Lactobacillus* spp. tenham uma resistência intrínseca à cefoxitina, o resultado deste estudo condizem com as conclusões obtidas por outros autores (Charteris *et al.*, 1998a; Delgado *et al.*, 2005).

Estudos de sensibilidade à antimicrobianos de BAL isoladas de QMA mostraram resultados compatíveis, em geral, aos encontrados na análise de B7 e D1. Sant'Anna *et al.* (2017), ao analisarem seis amostras de *Lactobacillus* spp. e duas amostras de *Pediococcus* spp., isolados de QMA do Campo das Vertentes, encontraram 75% de resistência à gentamicina, 87,5% à estreptomicina e 100% à vancomicina. Silva (2016), ao avaliar dez amostras de *Lactobacillus* spp. provenientes de QMA da região de Araxá relatou que 70% delas eram resistentes à estreptomicina e vancomicina, além de 80% serem sensíveis à penicilina. Da mesma forma, Costa *et al.* (2013), ao pesquisarem a sensibilidade de doze amostras de BAL isoladas de QMA da Serra da Canastra, verificaram 100% de resistência a vancomicina, 91,7% de resistência a estreptomicina e 100% de sensibilidade à tetraciclina. Nesse mesmo estudo, as amostras B7 e D1 também foram avaliadas e mostraram diferenças quanto à sensibilidade à ciprofloxacina, gentamicina e penicilina, conforme demonstrado na tabela 10. Os distintos perfis de susceptibilidade de B7 e D1 aos antimicrobianos observados em ambos os estudos, sugerem que o período de tempo que as bactérias foram armazenadas sob congelamento pode ter influenciado essas diferenças. Ray e Speck (1973) observaram que a temperatura de congelamento é um fator capaz de alterar a estabilidade genética bacteriana e, conseqüentemente, seus fenótipos quanto à expressão de fatores de resistência a esses compostos.

Tabela 10: Sensibilidade de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, isolados de QMA da Serra da Canastra – MG, à antimicrobianos, segundo Costa *et al.* (2013)

Antimicrobiano	Concentração µg	Amostra	
		B7	D1
Ciprofloxacina (CIP)	5	R	MS
Gentamicina (GEN)	10	S	S
Penicilina (PEN)	10	R	S

Fonte: Costa *et al.* (2013)

Assim como observado em outros estudos, a tolerância à ciprofloxacina reflete a principal diferença de sensibilidade entre B7, D1 e as BAL isoladas de QMA, visto que, das 28 amostras de BAL avaliadas nos três trabalhos citados, 25 (89,3%) demonstraram algum grau de resistência a esse fármaco.

Fenotípicamente, B7 e D1 apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. As resistências observadas podem ser explicadas, segundo trabalhos citados, pelas características intrínsecas desses micro-organismos. Porém, para selecionar probióticos com segurança, é importante determinar a presença de genes que conferem resistência aos grupos farmacológicos em questão, e avaliar se há a possibilidade de transferência a outras bactérias.

5.1.2. Resistência ao ácido gástrico artificial e sais biliares

Os percentuais de inibição ao ácido gástrico artificial e sais biliares e as classificações quanto à sensibilidade de B7 e D1 podem ser observados na tabela 11.

Tabela 11. Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância (tolerante – T, moderadamente tolerante – MT, sensível – S) ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e aos sais biliares de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG

Amostra	Percentual de inibição	
	Ácido gástrico artificial (pH = 2,0)	Sais biliares (0,3% Oxgall)
<i>L. plantarum</i> B7	16,65% (T)	57,95% (MT)
<i>L. rhamnosus</i> D1	1,06% (T)	46,10% (MT)

Segundo a classificação proposta por Acurcio *et al.* (2014), ambas as amostras de *Lactobacillus* apresentaram tolerância ao ácido gástrico artificial (< 40%) e tolerância moderada aos sais biliares (40% – 80%).

Sant'Anna *et al.* (2017) observaram percentuais de inibição variando de -24% a 11% para suco gástrico artificial (pH = 2,0) e -1% a 34% para sais biliares ao analisarem amostras de BAL isoladas de QMA do Campo das Vertentes. Quanto à *Lactobacillus* spp. isolados de QMA de Araxá, foram encontrados percentuais de inibição de -0,38% a 97% e 20,69% a 79,95% para ácidos e sais, respectivamente (Silva, 2016). Baseando nesses resultados, pode-se perceber uma maior tendência dos micro-organismos apresentarem maior sensibilidade aos sais biliares, comparado ao ácido, assim como foi observado no presente estudo.

Da mesma forma, Costa *et al.* (2013) ao avaliarem a sensibilidade de BAL isoladas de QMA da Serra da Canastra, encontraram níveis de inibição oscilando entre 0% a 19,68% para suco gástrico e 4,74% a 89,73% para sais biliares. Ainda, segundo os autores, as amostras B7 e D1 apresentaram o mesmo nível de tolerância demonstrado nesse estudo, com exceção do percentual de inibição de B7 pelos sais biliares. Nesse caso, a inibição de B7 atingiu o valor de 33,74%, sendo dessa forma classificada como tolerante. Além disso, B7 apresentou 18,86% (T) de inibição pelo ácido e D1 mostrou inibições de 8,10% (T) e 77,64% (MT) aos ácido e sais, respectivamente.

A tolerância a ambientes ácidos apresentada por *Lactobacillus* spp. ocorre a partir de mecanismos que regulam a homeostase do pH intracelular. Dentre esses mecanismos, destaca-se a atividade enzimática de ATPase que promove a translocação de prótons, apresentando maior eficiência quando o pH atinge valores entre 5,0 e 5,5. Além disso, quando o pH do ambiente atinge o valor de 4,0, é observada uma regulação celular que resulta na permeabilidade mínima da membrana, impedindo a entrada de prótons. A via da arginina desiminase é outro mecanismo de resposta frente ao estresse ácido. A partir da ação de várias enzimas, há o catabolismo de arginina e produção de amoníaco com o uso de íons H⁺, resultando na restauração do pH ideal (Angelis e Gobbetti, 2004).

Os sais biliares são altamente tóxicos para os micro-organismos devido sua atividade detergente sobre a membrana plasmática, capacidade de acidificação do citoplasma, indução do estresse oxidativo e de mecanismos de reparo de DNA, alterações no metabolismo de carboidratos e modificações na estrutura de proteínas. Porém, amostras de *Lactobacillus* podem adotar algumas estratégias frente a esse desafio

para diminuir a ação tóxica, como o efluxo ativo de bile, hidrólise de sais biliares e mudanças na arquitetura e composição das membranas e paredes celulares (Ruiz *et al.*, 2013).

Em administrações orais de probióticos, os micro-organismos se deparam com ambos os fatores durante o trajeto pelo trato gastrointestinal: o ambiente ácido no estômago e liberação de bile pelo ducto colédoco, presente no duodeno. Dessa forma, as injúrias causadas pelos ácidos gástricos ocorrem antes do contato dos probióticos com os sais biliares. Nesse contexto, Ruiz-Moyano *et al.* (2008) observaram que amostras de BAL com maior resistência a um ambiente ácido também demonstraram menor sensibilidade aos sais biliares. Esse perfil pode ser justificado pelo fato de micro-organismos conseguirem expressar mecanismos de resistência a outros fatores de estresse quando são previamente submetidos a injúrias sub-letais (Lin *et al.*, 2006). Assim, poderia se esperar que as amostras bacterianas resistentes a ácidos, como B7 e D1, apresentem também uma maior sobrevivência em contato com os sais biliares, quando expostas anteriormente ao primeiro fator. Essa hipótese sugere um aumento de possibilidade de seus usos como probióticos, apesar de terem se mostrado moderadamente tolerantes aos sais nos ensaios *in vitro* desse experimento, quando foram testadas isoladamente frente a cada fator. Além disso, considerando que ao longo do trato gastrointestinal os probióticos permanecem em contato com sais biliares por no máximo seis horas (Marteau *et al.*, 1995), os resultados do ensaio *in vitro* para tal período mostram uma maior resistência das duas amostras testadas frente a esse fator. A leitura do percentual de inibição de B7 e D1 com seis horas de contato com sais biliares foram de respectivamente 21,00% e 7,61%, sendo, dessa forma, ambas classificadas como tolerantes pelo critério utilizado (Acurcio *et al.*, 2014).

Os lactobacilos B7 e D1 apresentaram diferentes graus de tolerância aos sais e ácido, não sendo observada a inibição do desenvolvimento das duas bactérias por esses fatores. Dessa forma, a utilização de ambas as amostras como probióticos seria possível, desde que a concentração no sítio de ação fosse elevada ($> 10^7$ UFC/g) (Charteris *et al.*, 1998b).

5.1.3. Antagonismo *in vitro*

5.1.3.1. *Lactobacillus* spp. contra *L. monocytogenes*

As médias e desvios-padrão dos halos de inibição formados pelo antagonismo exercido por *Lactobacillus* spp. contra *L. monocytogenes* estão demonstrados na figura 1.

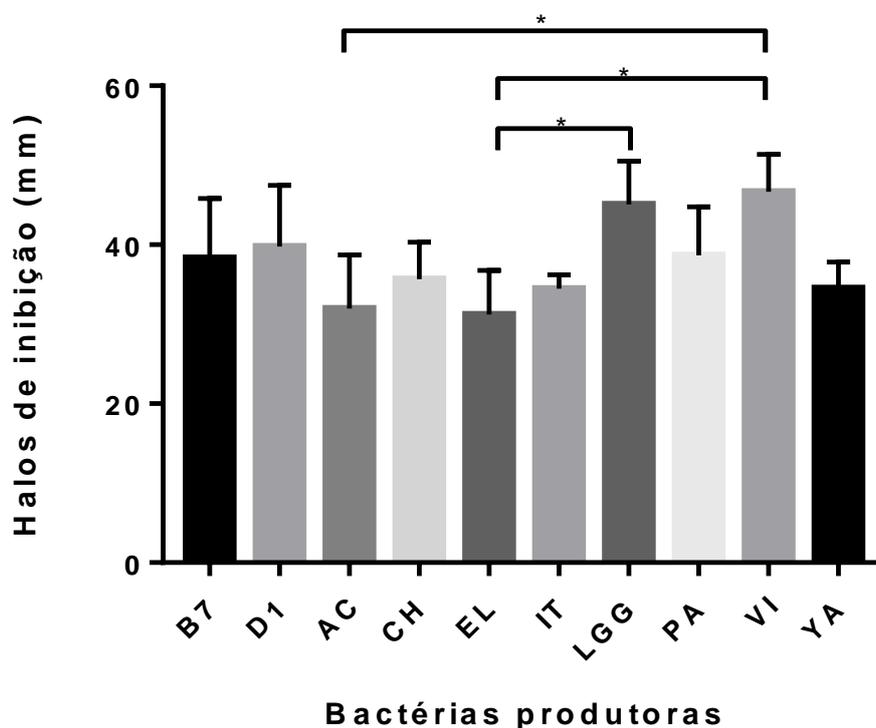


Figura 1. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus* spp. contra *L. monocytogenes*. Legenda: B7 – *L. plantarum*; D1 – *L. rhamnosus*; AC, EL, IT, PA, VI, YA – *L. casei*; CH – *L. paracasei*; LGG – *L. rhamnosus* GG. Barras seguidas por * indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que todos os lactobacilos testados foram capazes de formar halos de inibição contra *L. monocytogenes*. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos, que destacaram a importância dos metabólitos extracelulares produzidos pelas BAL no antagonismo contra esse patógeno. Sip *et al.* (2012) observaram que 284 das 800 (35%) amostras de BAL isoladas de queijo Golka, produzido na Polônia, apresentaram efeito inibitório contra *L. monocytogenes* pelo método *spot on the lawn*. Da mesma forma, 31,9% das 699 amostras de BAL isoladas de queijos Sicilianos foram capazes de antagonizar o crescimento do patógeno por essa técnica (Macaluso *et al.*, 2016). Trabalhos utilizando BAL isoladas de QMA também apresentaram resultados que demonstraram o potencial das bactérias desse grupo em antagonizar o crescimento *in vitro* de *L. monocytogenes* (Costa *et al.*, 2013; Silva, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2017).

Além de B7 e D1 demonstrarem um efeito antagonista satisfatório contra *L. monocytogenes*, devido a capacidade de inibição do crescimento do patógeno no meio, a média dos diâmetros dos halos de inibição de ambas não apresentaram diferenças estatísticas quanto à média dos diâmetros dos halos formados pelos outros lactobacilos testados, que possuem atividade probiótica comprovada e são utilizados em formulações farmacêuticas ou na produção de leites fermentados funcionais comerciais (Doron *et al.*, 2005; Nanno *et al.*, 2014). O desempenho semelhante de B7 e D1 com as demais amostras submetidas ao antagonismo *in vitro* contra *L. monocytogenes* é desejável, pois demonstra uma atividade inibitória de mesma intensidade entre os micro-organismos testados e probióticos de referência.

As únicas diferenças apontadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) são entre VI e AC, VI e EL, e LGG e EL. As diferenças entre os diâmetros dos halos podem ocorrer pela menor capacidade de produção de compostos de caráter inibitório e/ou pela produção de metabólitos de pesos moleculares mais elevados que dificultam sua difusão através do ágar (Savino *et al.*, 2011)

Dessa forma, é possível concluir que, B7 e D1 possuem capacidade de antagonizar *in vitro* *L. monocytogenes* equiparável àquela observada em probióticos reconhecidos e comercialmente utilizados.

5.1.3.2. *Lactobacillus plantarum* B7 contra *Lactobacillus rhamnosus* D1

Na avaliação do antagonismo *in vitro* entre B7 e D1, com ambas sendo utilizadas como produtoras e reveladoras, não foi observada formação de halos de inibição, demonstrando que um lactobacilo não interfere negativamente no desenvolvimento do outro. A ausência de antagonismo entre as amostras possibilita que B7 e D1 sejam utilizadas em conjunto para produção de leites fermentados sem que haja a supressão do crescimento de uma pela outra.

A ausência de antagonismo entre diferentes *Lactobacillus* spp. pelo método de *spot on the lawn* também foi demonstrada em outros trabalhos, incluindo amostras isoladas de QMA (Costa *et al.*, 2013; Silva, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2017).

5.2. Teste de proteção *in vivo*

5.2.1. Modelo de infecção experimental

Os animais infectados pelas vias oral e intraperitoneal, com os inóculos apresentados na tabela 8, não apresentaram sinal visível de enfermidade ao longo dos 15 dias de observação, não sendo registrados ocorrência de morbidade ou mortalidade nesses grupos, independentemente da dose de inoculação utilizada. Da mesma forma, os camundongos desafiados com inóculos de 10^5 UFC de *L. monocytogenes* pela veia caudal, mantiveram-se clinicamente saudáveis, sem demonstrar sinal aparente de enfermidade ou apresentarem óbitos. Pela ausência de patogenicidade, tais doses e vias de inoculações não foram selecionadas para reprodução da listeriose em modelo murino. Entretanto, os animais que receberam as doses intravenosas de 10^6 UFC e 10^7 UFC do patógeno desenvolveram sinais clínicos que resultaram em morte em alguns casos, conforme demonstrado na tabela 12.

A resistência dos animais à infecção pelas vias oral e intraperitoneal pode ser explicada por alguns fatores relacionados com a interação patógeno-hospedeiro. *L. monocytogenes* é um patógeno que depende da expressão de glicoproteínas no epitélio do hospedeiro, como as caderinas, para invasão dessas células. Em outras palavras, a patogenicidade desse micro-organismo está ligada a capacidade de proteínas bacterianas de superfícies, chamadas internalinas (InIA e InIB), se ligarem a receptores epiteliais (E-caderina e MET) para promoverem mecanismos invasivos. Diante disso, a maioria dos modelos animais utilizados para essa finalidade, incluindo os murinos, apresentam receptores epiteliais de baixa afinidade com InIA e InIB, limitando seu uso para avaliação de infecções experimentais

(Hoelzer *et al.*, 2012; D’Orazio, 2014). Além disso, uma vez na corrente sanguínea, 90% das células de *L. monocytogenes* são retiradas da circulação por células de Kupffer presentes no fígado, sendo eliminadas quase em sua totalidade (Mandel e Cheers, 1980; Llorente e Schnabl, 2016).

Becattini *et al.* (2017) destacaram a importância da própria microbiota intestinal na proteção do organismo contra a patogenicidade de *L. monocytogenes*, a partir da redução da colonização desse patógeno no intestino e prevenção da disseminação sistêmica. Naquele estudo, bactérias da ordem Clostridiales isoladas do intestino de camundongos convencionais demonstraram atividade antagonista *in vitro* contra *L. monocytogenes*. Após serem transferidas para o trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes, foi observado um ganho na resistência desses animais contra infecção por esse micro-organismo.

Tabela 12: Progressão clínica de listeriose em camundongos BALB/c após infecção intravenosa experimental (veia caudal)

Dose	Animal	Dias pós-infecção					
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
10⁷ UFC	I	Sinais clínicos	Morte	-	-	-	-
	II	Sinais clínicos	Morte	-	-	-	-
	III	Sem alterações	Sinais clínicos	Morte	-	-	-
10⁶ UFC	I	Sem alterações	Sinais clínicos	Morte	-	-	-
	II	Sem alterações	Sinais clínicos	Morte	-	-	-
	III	Sem alterações	Sinais clínicos	Sinais clínicos	Sinais clínicos	Sinais clínicos	Melhora clínica

Pode-se perceber que a infecção intravenosa com a dose de 10⁷ UFC de *L. monocytogenes* foi letal a todos os animais, com os óbitos se concentrando nos dias 2 e 3 pós-desafio. Quanto ao inóculo de 10⁶ UFC, os animais mostraram sinais clínicos um pouco mais tardios que o primeiro grupo, com as mortes ocorrendo no 3º dia após inoculação. A partir do 6º dia pós-infecção, o camundongo sobrevivente demonstrou uma notável melhora clínica, que persistiu nos dias que se sucederam. A partir desse ponto, não foi observado o desenvolvimento de sinais clínicos e/ou óbito.

Clinicamente, os sinais desenvolvidos nos animais não se caracterizaram por alteração específica. De uma forma geral, os enfermos apresentaram apatia, anorexia, pelos arrepiados, conjuntivite e tremores. Sinais semelhantes foram observados no trabalho de Hardy *et al.* (2015) quatro dias após o desafio intravenoso com *L. monocytogenes* (10⁵ UFC).

Baseado nos resultados obtidos, a dose intravenosa de 10⁶ UFC foi escolhida como modelo de infecção experimental, uma vez que, dentre as doses testadas, apresentou capacidade de reproduzir a doença em camundongos BALB/c de forma menos acentuada que as demais.

5.2.2. Curva de sobrevida

As curvas de sobrevida dos animais do grupo controle e tratados com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 após infecção experimental por *L. monocytogenes* podem ser observadas nas figuras 2 e 3 a seguir.

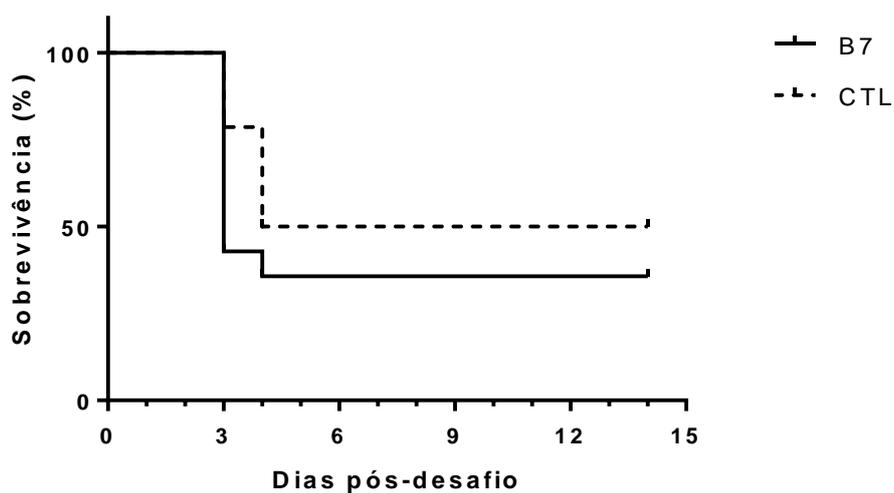


Figura 2. Sobrevida (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com *L. plantarum* B7 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com *L. monocytogenes* (10^6 UFC) via veia caudal. Teste Log-rank ($p < 0,05$).

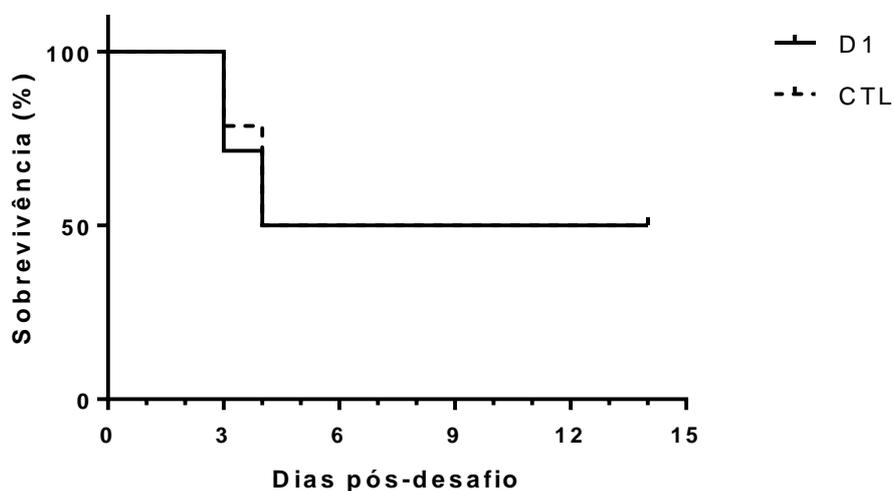


Figura 3. Sobrevida (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com *L. rhamnosus* D1 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com *L. monocytogenes* (10^6 UFC) via veia caudal. Teste Log-rank ($p < 0,05$).

Conforme demonstrados nos gráficos, os óbitos concentraram-se nos dias 3 e 4 pós-desafio independentemente do grupo analisado, ressaltando um quadro agudo decorrente da infecção. No grupo

controle foram observadas três mortes no dia 3 (21,43% dos animais) e quatro mortes no dia 4 (28,57%), totalizando sete animais (50%). O grupo B7 apresentou oito óbitos no dia 3 (57,14%) e um no dia 4 (7,14%), resultando em nove mortes (64,28%). O grupo D1 totalizou sete mortes (50%), sendo quatro no dia 3 (28,57%) e três no dia 4 (21,43%).

A análise estatística dos resultados indicou ausência de diferenças ($p > 0,05$) entre as taxas de sobrevivência de cada grupo, demonstrando a inexistência de efeito protetor aparente dos lactobacilos quanto à prevenção de mortes causada por *L. monocytogenes*, sob tais condições de infecção.

Apesar do desempenho de B7 e D1 ter sido satisfatório nos testes *in vitro*, pela capacidade de inibição de *L. monocytogenes*, o mesmo não se pôde concluir nos testes *in vivo*. Alguns fatores presentes em um organismo vivo podem dificultar a atividade e o estabelecimento de probióticos no trato gastrointestinal e, consequentemente, impedir que eles desempenhem os mecanismos que resultam nos efeitos protetores ao hospedeiro. Dentre esses fatores, podem ser citados: a influência da microbiota residente, a produção de muco pelo epitélio intestinal, o fluxo contínuo do conteúdo presente no lúmen do intestino e os movimentos peristálticos (Reid e Burton, 2002; Servin, 2004; Sant'Anna *et al.*, 2017).

Bujalance *et al.* (2014) também mostraram a ineficácia de potenciais probióticos em promover proteção à ocorrência de listeriose. Amostras de *L. casei* e *L. plantarum* haviam sido selecionadas para realizações de ensaios com animais, uma vez que demonstraram um efeito inibitório *in vitro* contra enteropatógenos, incluindo *L. monocytogenes*. Porém, após três dias da infecção experimental de camundongos BALB/c, não foram observadas diferenças significativas entre as contagens bacterianas nos baços e linfonodos mesentéricos dos grupos controle e dos grupos que receberam o tratamento.

Por outro lado, em alguns trabalhos em que foi possível a reprodução da doença pela inoculação oral de *L. monocytogenes*, foi mostrado que o tratamento por *Lactobacillus* spp. pode ser eficiente para prevenir a morte de camundongos (Bambirra *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que, provavelmente, os mecanismos desempenhados pelos probióticos ao nível do epitélio intestinal sejam mais eficazes em suprimir a atividade do patógeno do que as alterações promovidas de forma sistêmica.

Apesar dos resultados não demonstrarem um efeito protetor *in vivo* aparente de B7 e D1 contra *L. monocytogenes*, foi possível determinar um modelo de infecção agudo em murinos, capaz de causar uma taxa de mortalidade de 50% dos animais desafiados após quatro dias de infecção. Embora o estudo não tenha sido focado e realizado utilizando metodologias próprias para determinação da dose letal mediana (DL_{50}), o conceito de DL_{50} apresenta certo grau de similaridade com o resultado obtido: dose de uma toxina, radiação ou patógeno capaz de causar a morte de 50% dos animais de certa espécie quando expostos a ela (Randhawa, 2009). Devido a essa semelhança, é possível traçar uma comparação entre essa conclusão e o resultado obtido em trabalhos sobre a determinação da DL_{50} de listeriose em modelos murinos. No trabalho de Liu *et al.* (2003) foi determinada a patogenicidade de 12 amostras de *L. monocytogenes* a partir da quantificação da DL_{50} após uma semana do desafio. Após a inoculação intraperitoneal do patógeno em camundongos A/J foram observados os valores descritos na tabela 13.

Tabela 13: DL₅₀ apresentada por amostras de *L. monocytogenes* após infecção experimental intraperitoneal em camundongos A/J

Amostra de <i>L. monocytogenes</i>	Sorotipo	DL ₅₀ (UFC)
ATCC 19112	2	1,6 x 10 ⁹
ATCC 19114	4a	1,9 x 10 ¹⁰
ATCC 19115	4b	6 x 10 ⁸
ATCC 19116	4c	2,6 x 10 ⁸
ATCC 19117	4d	8,8 x 10 ⁸
ATCC 19118	4e	7,8 x 10 ⁹
ATCC 15313	1	>1,2 x 10 ¹¹
EGD	1/2a	<1,1 x 10 ⁷
HCC8	1	<7 x 10 ⁸
HCC25	4	3,5 x 10 ¹⁰
874	Não determinada	<8 x 10 ⁷
1002	Não determinada	5,2 x 10 ⁸

Fonte: Liu *et al.* (2003)

Percebe-se que, embora a linhagem de camundongos seja diferente, as concentrações encontradas capazes de causar 50% de óbitos em populações de camundongos apresentaram valores acima dos encontrados neste estudo. Esses resultados sugerem, de uma forma geral, que é necessário um desafio maior pela via intraperitoneal (> 10⁷ UFC), comparado à via venosa, para reproduzir um modelo de infecção experimental de mesma intensidade.

Dortet *et al.* (2011) observaram valores menores de DL₅₀ para animais BALB/c infectados por *L. monocytogenes* pela via intravenosa ao final de dez dias de observação. As doses variaram de 1,3 x 10³ a 2,2 x 10⁴ UFC de acordo com a amostra do patógeno. Valores aproximados a esses foram encontrados por Cabanes *et al.* (2004) após 72 horas da inoculação intravenosa em camundongos da mesma linhagem: 8 x 10³ e 3 x 10⁴ UFC.

Diante dessas conclusões, sugere-se que a amostra utilizada no estudo possua uma menor patogenicidade. Esse fato é evidenciado no estudo de Liu *et al.* (2003), conforme descrito na tabela 13, em que é demonstrado que o mesmo micro-organismo (*L. monocytogenes* ATCC 15313) necessitou de uma maior contagem, comparada aos demais, para ser capaz de expressar a DL₅₀.

5.2.3. Desenvolvimento ponderal

Os ganhos de peso dos animais dos grupos controle, B7 e D1 ao longo do pré-tratamento e pós-desafio podem ser observados nas figuras 4 e 5.

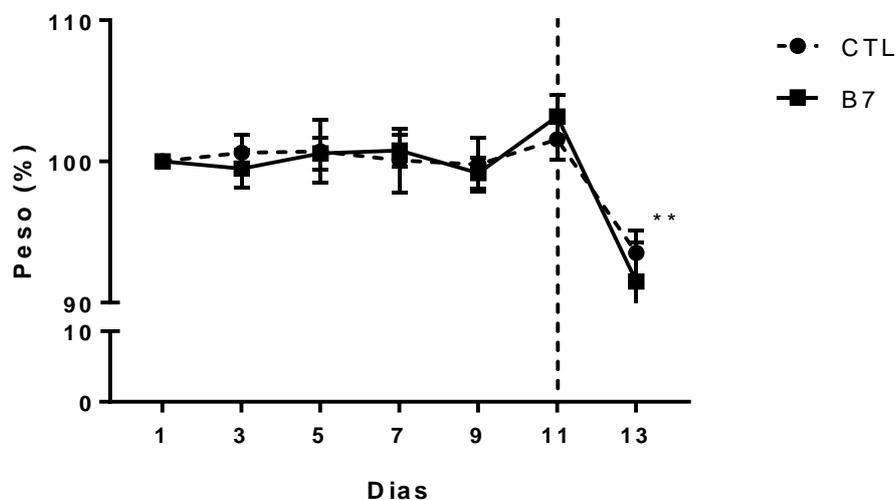


Figura 4. Peso relativo (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com *L. plantarum* B7 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com *L. monocytogenes* (10^6 UFC) via veia caudal (dia 11). *Teste Two-way Anova, pós-teste de Sidak ($p < 0,05$).

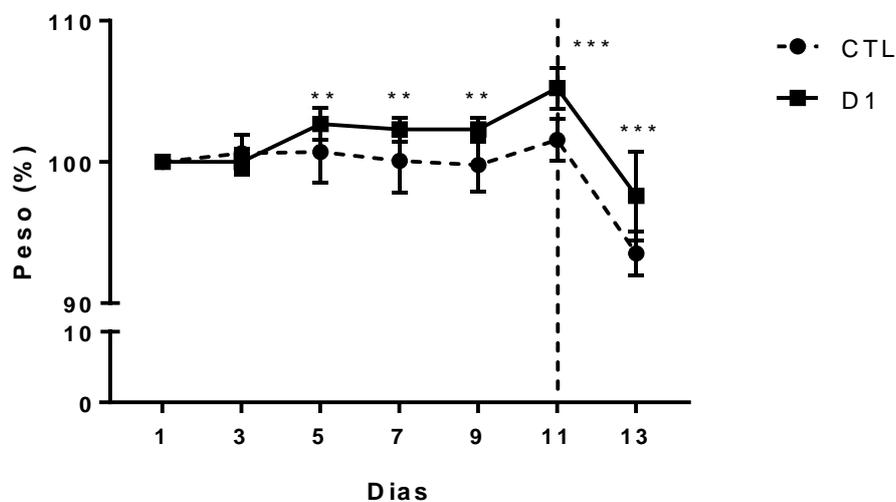


Figura 5. Peso relativo (%) de camundongos BALB/c (n=14) tratados com *L. rhamnosus* D1 e com salina 0,9% (controle) e desafiados com *L. monocytogenes* (10^6 UFC) via veia caudal (dia 11). *Teste Two-way Anova, pós-teste de Sidak ($p < 0,05$).

Ao observar os gráficos, pode-se perceber que ao longo do pré-tratamento não houve diferenças estatística entre o desenvolvimento dos animais do grupo controle e B7. Porém, após o desafio, nota-se uma maior perda de peso nos animais que receberam *L. plantarum*, indicando que o tratamento pelo lactobacilo afeta desfavoravelmente o desenvolvimento ponderal dos animais. Segundo Million *et al.* (2012), a administração de algumas espécies de *Lactobacillus* pode levar a diminuição do ganho de peso de um indivíduo devido mecanismos antiobesidade desempenhados por esses micro-organismos.

Dentre as espécies que mais se destacam quanto a essa característica, são citadas *L. gasseri* e *L. plantarum*. Em alguns estudos de antagonismo *in vivo* contra enteropatógenos envolvendo *L. plantarum*, também se observou menor ganho de peso do grupo tratado por esse micro-organismo (Frizzo *et al.*, 2010).

Por outro lado, o grupo D1 apresentou maior desenvolvimento ponderal ao longo do período de administração do probiótico comparado ao grupo controle. Mesmo após a queda de peso em decorrência do desafio com *L. monocytogenes*, os camundongos desse grupo continuaram a ter um peso relativo significativamente maior que o grupo controle, como consequência da condição física adquirida antes do processo infeccioso. Embora o maior peso corporal do grupo D1 não tenha refletido em efeitos protetores aparentes no estudo da mortalidade dos animais, esse é um indicativo de melhora no vigor corpóreo que poderia, em condições normais de infecção, resultar em um abrandamento do quadro clínico resultante do desafio.

Diante do exposto, apesar dos resultados de antagonismo *in vivo* não terem sido conclusivos diante do modelo experimental utilizado, os dados sobre antagonismo *in vitro* indicaram um potencial probiótico dos lactobacilos testados. Dessa forma, tais lactobacilos foram selecionados para elaboração e avaliação de aceitação de leite fermentado de cabra.

5.3. Leite fermentado de cabra com *Lactobacillus* spp.

5.3.1. Avaliação do leite de cabra cru

Os resultados de análises de composição química, CCS e CBT do leite cru, utilizado como matéria-prima para produção dos leites fermentados, nas três repetições, podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14. Médias e desvios-padrão de resultados de análises de composição química, CCS e CBT do leite de cabra cru, considerando três repetições – lotes distintos

Parâmetros	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Sólidos (g/100g)	ESD (g/100g)	CCS (log células/mL)	CBT (log UFC/mL)
Médias	3,29	2,81	4,30	11,29	8,00	5,84	4,15
Desvio-padrão	± 0,12	± 0,01	± 0,04	± 0,16	± 0,07	± 0,01	± 0,23

De acordo com a Instrução Normativa 37 (Brasil, 2000), que regulamenta a produção, identidade e qualidade do leite de cabra, os leites analisados apresentam-se em conformidade quanto aos teores de gordura (maior que 2,9g/100g para leite integral), proteína total (mínimo de 2,8g/100g), lactose (mínimo de 4,3g/100g) e CBT (máximo de 500.000 UFC/mL).

Embora o teor de ESD tenha se apresentado menor que o estabelecido pela legislação (mínimo de 8,2g/100g), em outros estudos sobre composição do leite caprino cru foram obtidos resultados semelhantes (Costa *et al.*, 2014; El-Hatmi, 2015; Figueiredo, 2017).

Embora não haja um padrão legal para a CCS em leite de cabra, existe uma correlação entre alta CCS e casos de infecção intramamária. Entretanto, fatores fisiológicos relacionados aos caprinos favorecem que seus leites apresentem altas CCS sem que a saúde da glândula mamária esteja comprometida (Leitner *et al.*, 2016). Diferentemente da secreção do tipo merócrina dos componentes do leite que ocorre no epitélio alveolar dos bovinos, nas cabras essa secreção é do tipo apócrina. A principal característica desse tipo de secreção é descamação ocorrida na parte apical das células epiteliais durante a liberação dos componentes do leite, resultando na formação de partículas citoplasmáticas que são contabilizadas como células somáticas nos métodos de determinação desse parâmetro (Shah *et al.*, 2017). Devido a essa peculiaridade, cabras saudáveis podem apresentar CCS de 10^6 células/mL sem indicativo de alterações infecciosas na glândula mamária (Paape *et al.*, 2007).

No entanto, não há, no Brasil, determinação legal quanto aos valores de CCS determinantes da qualidade do leite de cabra, mas comparando com dados da literatura nacional, percebe-se que os valores aqui obtidos encontram-se dentro de intervalos citados por outros autores (Arcuri *et al.*, 2004; Figueiredo, 2017)

Por fim, os leites crus obtidos para produção dos lotes de leites fermentados não apresentavam inibidores de crescimento microbiano pelo teste TTC, sendo, portanto, considerados aptos à inoculação de bactérias lácticas para iniciar o processo fermentativo.

5.3.2. Curva de fermentação do leite de cabra pelos lactobacilos

As médias de pH, acidez titulável e contagem de *Lactobacillus* durante a fermentação dos leites de cabra ao longo de 24 horas estão apresentadas nas figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

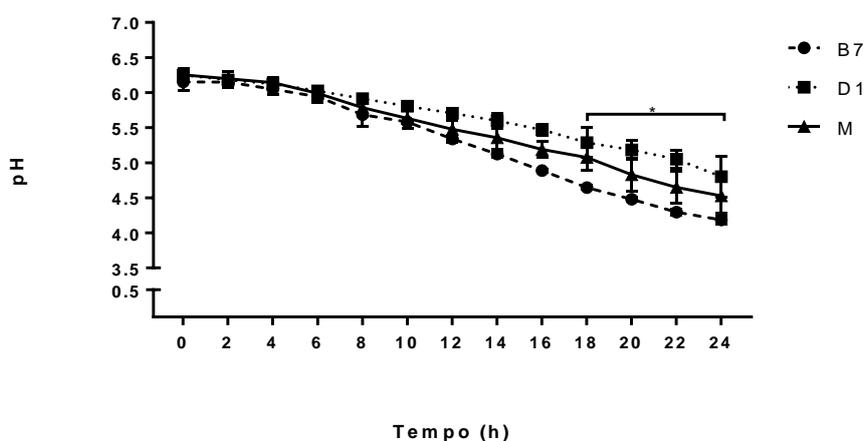


Figura 6. Médias de pH durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por *Lactobacillus plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1 e ambos (M), considerando três repetições. * Comparações entre médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

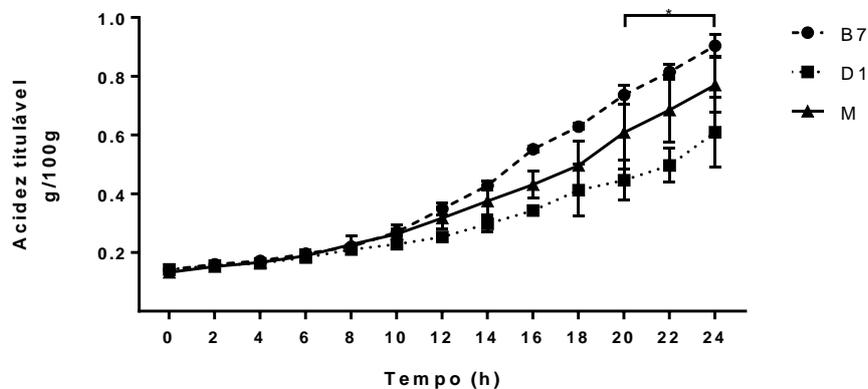


Figura 7. Médias de acidez titulável durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por *Lactobacillus plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1 e ambos (M), considerando três repetições. * Comparações entre médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

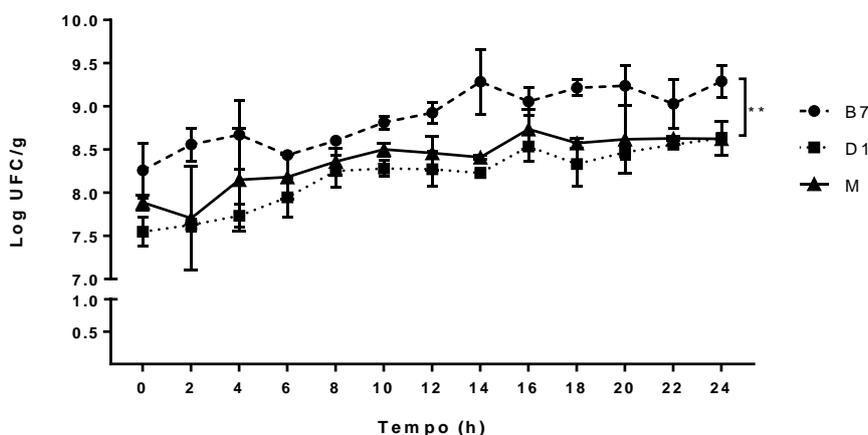


Figura 8. Médias de contagem bacteriana durante 24 horas de fermentação de leite de cabra por *Lactobacillus plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1 e ambos (M), considerando três repetições. * Comparações entre médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Baseado nos resultados expressos nos gráficos, observa-se que B7 apresentou um maior crescimento na etapa de preparação dos inóculos, de acordo com a concentração de células mais elevada no tempo 0 de fermentação. Essa diferença inicial entre os inóculos provavelmente foi um dos fatores determinantes da maior produção de ácidos por B7, que culminou no menor pH e maior acidez entre os três tratamentos. Por outro lado, embora D1 não tenha demonstrado diferença significativa entre sua contagem e a contagem das bactérias na cultura mista, este apresentou uma menor capacidade de fermentação refletida pelo baixo valor de acidez e maior pH. Por fim, percebeu-se que M apresentou pH e acidez titulável com valores intermediários aos valores obtidos nos leites fermentados por B7 e D1,

uma vez que esse fermento é composto por quantidades equivalentes (1,25% v/v de cada) de ambos os micro-organismos. Valores intermediários de parâmetros avaliados em leites fermentados por coculturas, comparados aos valores dos resultados das culturas puras, também foram observados por Ranadheera *et al.* (2016). Esses resultados sugerem que outros fatores, além da contagem inicial, podem influenciar esses parâmetros ao longo da fermentação.

A menor produção de ácidos orgânicos por *L. rhamnosus* D1, comparada a outras espécies, também foi demonstrada no estudo de Zalán *et al.* (2010). Nesse caso, entre dez amostras de lactobacilos testadas, *L. rhamnosus* apresentou menor capacidade de produção desses compostos, resultando em baixos valores de acidez titulável após 18 horas de incubação e, em diferentes meios, como caldo MRS, leite e suco de alcachofra. Associado a isso, estudos mostraram que *L. rhamnosus* não se desenvolvem no leite na mesma intensidade que cresceriam em um meio específico, fato que pode contribuir para o menor grau de fermentação no produto (Gaudreau *et al.*, 2005).

Os valores de pH ao longo da fermentação dos leites de cabra não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos do início da fermentação até as 10 horas que se sucederam. Com 12 horas passadas da inoculação dos micro-organismos, B7 começou a apresentar valores mais baixos em relação aos outros fermentos. A partir das 20 horas até o final da análise, foram observadas diferenças estatísticas entre os três tratamentos, sendo os pH finais de B7, D1 e M, respectivamente 4,18, 4,8 e 4,53.

A curva de acidez titulável apresentou um perfil parecido: semelhança entre as médias dos três tratamentos nas primeiras 10 horas e diferenças significativas a partir das 20 horas após início do processo. Dessa forma, ao final das 24 horas observaram-se respectivamente os valores de 0,90, 0,61 e 0,77g de ácido láctico em 100g de leite fermentado por B7, D1 e M. O aumento da acidez titulável ao longo do tempo associou-se diretamente com a diminuição do pH, pois esses parâmetros refletem a produção de ácidos e, conseqüente, acidificação do produto durante o metabolismo fermentativo dos lactobacilos adicionados ao leite.

Comparando os resultados obtidos na avaliação da fermentação do leite de cabra, Minervini *et al.* (2009) observaram que a fermentação por *L. plantarum* apresentou um decréscimo de pH mais acentuado, atingindo valores de 4,6 após oito horas de incubação a 30°C. Entretanto, os inóculos utilizados nesse estudo tinham uma menor contagem de micro-organismos (10^7 UFC/g) e foram adicionados em menor concentração (1% v/v). Da mesma forma, Salva *et al.* (2011) mostraram que fermentos contendo diferentes proporções de *L. rhamnosus* e *Streptococcus thermophilus* causaram uma queda no pH do leite de cabra de forma mais vertiginosa, quando incubados a 42°C.

Embora não haja padrões estabelecidos especificamente para leites fermentados caprinos, o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) estabelece um intervalo mínimo acidez de 0,6 a 2,0g/100g e uma contagem mínima de bactérias lácticas de 10^6 UFC/g. Além disso, o pH final deve estar ajustado entre 4,0 à 5,0 ao longo de todo período de vida de prateleira do produto para não prejudicar a viabilidade dos *Lactobacillus* (Lee e Salminen, 1995). Baseado nessas informações e nos dados obtidos pela curva de fermentação, determinou-se o tempo de fermentação de cada tratamento para produção dos leites fermentado de cabra, conforme demonstrado na tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite fermentado de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1 e ambos (M) em diferentes tempos de fermentação

Tratamento	Tempo de fermentação	pH	Acidez titulável	Contagem bacteriana
B7	16h	4,89	0,55g/100g	1,1 x 10 ⁹ UFC/g
D1	24h	4,80	0,61g/100g	4,2 x 10 ⁸ UFC/g
M	20h	4,83	0,61g/100g	4,2 x 10 ⁸ UFC/g

A definição adequada de cada tempo de fermentação possibilitou que os valores dos parâmetros de qualidade dos produtos atinjissem resultados aproximados de pH, acidez titulável e contagem bacteriana, além de adequarem à legislação (Brasil, 2007). Dessa forma, os três tratamentos encontraram-se padronizados, minimizando os efeitos que uma maior ou menor acidez, por exemplo, poderiam desencadear na análise sensorial.

Assim, B7, D1 e M apresentaram contagens bacterianas acima do estabelecido pelo RTIQ de leites fermentados, garantindo margem de segurança para que um valor mínimo de bactérias (10⁶ UFC/g) permaneça viável no produto final ao longo de todo seu prazo de validade (Brasil, 2007). Além disso, essas contagens atingiram valores similares à concentração de probióticos em produtos com apelo funcional, segundo proposto por Tamime *et al.* (2005).

5.3.3. Parâmetros físico-químicos antes e durante a estocagem

As médias e desvios-padrão dos parâmetros físico-químicos dos leites fermentados analisados nos dias 0, 15 e 30 de estocagem a 7°C estão demonstrados nas tabelas 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

Tabela 16: Acidez titulável dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Acidez titulável (g/100g de ácido láctico)			
	B7	D1	M	YA
0	0,68Bac ± 0,10	0,49Bb ± 0,07	0,65Ca ± 0,12	0,78Bc ± 0,11
15	0,92Aa ± 0,02	0,73Ab ± 0,04	0,90Aa ± 0,09	0,91Aa ± 0,03
30	0,94Aa ± 0,14	0,73Ab ± 0,04	0,80Bb ± 0,09	0,76Bb ± 0,03

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey (p<0,05).

A concentração de ácido láctico, de uma forma geral, apresentou valores mais elevados no leite fermentado por B7, quando comparado aos demais tratamentos, sendo essa diferença mais evidenciada no dia 30 de estocagem. Ao analisar o período de armazenamento do produto, é possível perceber uma influência do tempo no acréscimo de acidez nos leites B7 e D1. Da mesma forma, ao comparar os resultados obtidos com os padrões estabelecidos pelo RTIQ de leites fermentados, observa-se que apenas a amostra D1 no tempo 0 não apresentou acidez titulável entre 0,6 e 2,0g/100g; porém, o mesmo produto estava adequado quanto a esse parâmetro nos demais períodos de avaliação (Brasil, 2007).

Acidez titulável de leites fermentados de cabra, analisada durante a estocagem em outros trabalhos, mostraram valores que se assemelham aos intervalos obtidos entre os tratamentos. Salva *et al.* (2011) observaram resultados de 0,60 a 0,95g/100g de ácido láctico em leites fermentados de cabra refrigerados a 4°C por 15 dias, variando segundo o tempo de estocagem e a concentração e proporção de inóculos de *L. rhamnosus* e *S. thermophilus* adicionados. No trabalho de Bessa (2014) esses valores foram de aproximadamente 0,75, 0,83 e 0,87g/100g nos dias 1, 14 e 28 de estocagem a 8°C em leites fermentados de cabra por culturas compostas de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* e *Bifidobacterium animalis*. Por outro lado, Eissa *et al.* (2010) encontraram maiores valores de acidez titulável, variando de 0,74 à 2,58g/100g, após armazenamento de iogurte de leite de cabra à 4°C durante 15 dias. Santos *et al.* (2017), ao avaliarem leites fermentados de cabra por *L. rhamnosus*, armazenados por 1, 14 e 28 dias, observaram os valores de acidez titulável de 0,52, 0,69 e 0,87g/100g, respectivamente.

A diminuição da acidez titulável ao longo do período de estocagem, como observado nos leites M e YA após 30 dias, também foi relatada em outros estudos acerca do efeito do armazenamento de leites fermentados (de cabra e vaca) sobre esse parâmetro (Bozanik e Tratnik, 2001; Damin *et al.*, 2008; Güler e Gürsoy-Balci, 2011). Amani *et al.* (2016) observaram que culturas com alta atividade proteolítica tinham menor capacidade de acidificação do leite durante a estocagem, podendo resultar até mesmo no aumento do pH e diminuição de acidez titulável do produto ao longo do período de armazenamento.

Tabela 17: pH dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	pH			
	B7	D1	M	YA
0	4,53Abc ± 0,30	5,20Aa ± 0,19	4,72Ab ± 0,29	4,36Ac ± 0,20
15	3,99Bb ± 0,09	4,42Ba ± 0,27	4,14Bb ± 0,07	4,08Bb ± 0,13
30	3,93Bb ± 0,10	4,21Ca ± 0,18	4,02Bb ± 0,10	4,01Bb ± 0,13

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey ($p < 0,05$).

Os menores valores de pH foram observados no leite B7, coincidindo com a maior concentração de ácido láctico obtida na análise de acidez titulável. Porém, não houve diferenças com o pH encontrado nos produtos M e YA, independentemente do período analisado. Por outro lado, D1 apresentou pH significativamente maior que os três em todas as análises.

Independentemente da cultura, observou-se uma tendência de diminuição do pH do leite fermentado ao longo do período de refrigeração a 7°C. O aumento da acidez titulável e a diminuição do pH durante a estocagem ocorrem devido à persistente atividade das bactérias lácticas, que conseguem manter suas atividades metabólicas em certo nível, mesmo quando expostas a temperaturas de 0 a 5°C (Pereira, 2002). A pós-acidificação ocorrida durante a estocagem do produto, quando ocorre de forma exacerbada, pode levar a algumas alterações indesejáveis nas suas características. Dentre essas modificações, podem ser citadas a diminuição das contagens de lactobacilos e a maior rejeição do produto por parte dos consumidores, em decorrência do desenvolvimento de maior acidez (Penna *et al.*, 2007; Coggins *et al.*, 2010).

No trabalho de Eissa *et al.* (2010) foi observado um maior pH no tempo 0 de estocagem (5,71). Porém, aos 15 dias, o produto mostrou uma queda considerável no valor do pH, atingindo o valor de 2,67.

Bessa (2014) encontrou valores condizentes aos obtidos nesse estudo, com o pH apresentando valores aproximados de 4,60, 4,45 e 4,35 com 0, 14 e 28 dias de refrigeração. Nesses mesmos períodos, Santos *et al.* (2017) observaram pH de 4,45, 4,38 e 3,83 em leites fermentados de cabra por *L. rhamnosus*.

Embora não haja um padrão estabelecido para pH de leites fermentados em legislações, os valores encontrados podem ser comparado com os determinados pelo estudo de Farias *et al.* (2012), no qual foram mensurados os pH de leites fermentados comerciais brasileiros. Os valores encontrados pelos pesquisadores variavam entre 3,61 e 4,11, sendo que, B7, M e YA conseguiram atingir valores contidos nesse intervalo ao longo do período de armazenamento.

Considerando ainda que o leite de cabra tem maior tendência à lipólise espontânea e que os ácidos graxos livres poderiam afetar de alguma forma a fermentação, foi quantificado índice de ácidos graxos livres nos leites fermentados de cabra. Os valores observados encontram-se na tabela 18.

A análise de ácidos graxos livres nos leites fermentados produziu indicou ausência de diferenças estatísticas quanto à concentração desses compostos entre os quatro tratamentos, tanto com 0 como com 15 e 30 dias de estocagem. Porém, foram observados aumentos significativos do teor dessas substâncias dentro de cada produto ao longo do tempo, evidenciadas na avaliação feita com 30 dias de refrigeração. A lipólise pode ocorrer no leite a partir da atividade de enzimas como lipases produzidas por micro-organismos psicrotróficos ou naturais do próprio leite. Entretanto, o tratamento térmico aplicado sobre o leite minutos após sua obtenção é um fator que elimina tais riscos por desnaturar as lipases endógenas e eliminar as bactérias produtoras, embora não tivesse efeito sobre as enzimas que já tiverem sido previamente produzidas por psicrotróficos (Maziero *et al.*, 2010).

Tabela 18: Teor de ácidos graxos livres dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Ácidos graxos livres (μ equiv./mL)			
	B7	D1	M	YA
0	1,2B \pm 0,12	1,09B \pm 0,11	1,2B \pm 0,21	1,09B \pm 0,20
15	1,09B \pm 0,10	1,07B \pm 0,18	1,07B \pm 0,10	1,07B \pm 0,16
30	1,55A \pm 0,24	1,41A \pm 0,22	1,59A \pm 0,28	1,8A \pm 1,05

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey ($p < 0,05$).

Dessa forma, conclui-se que a atividade lipolítica exercida por B7, D1, M e YA no leite fermentado de cabra não apresentou diferenças quanto à intensidade, pois em todos os produtos avaliados o aumento desses compostos mostrou perfil semelhante ao longo dos 30 dias de estocagem a 7 °C.

Quanto aos teores de gordura (Tabela 19), todos os produtos encontraram-se conforme a legislação, que classifica os leites fermentados como integrais quando possuem uma concentração de gordura de 3,0 a 5,9g/100g. Apenas o leite B7 com 30 dias de estocagem apresentou valor inferior ao intervalo, enquadrando-se como um leite fermentado parcialmente desnatado (Brasil, 2007). Porém, estatisticamente não foram observadas diferenças entre esse valor e os teores de gordura dos leites fermentados com 0 e 15 dias, que se adequaram como produtos integrais.

Tabela 19: Teor de gordura dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Gordura (g/100g)			
	B7	D1	M	YA
0	3,04a ± 0,14	3,34Ab ± 0,20	3,23Aab ± 0,14	3,32Ab ± 0,36
15	3,01 ± 0,27	3,25A ± 0,31	3,13AB ± 0,11	3,03B ± 0,11
30	2,9 ± 0,23	3,07B ± 0,15	3,04B ± 0,05	3,00B ± 0,09

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey ($p < 0,05$).

Quanto aos tratamentos D1, M e YA, observou-se uma diminuição significativa da concentração de gordura ao longo do tempo de armazenamento, sem que essa redução tenha interferido na classificação legal dos leites fermentados. Irigoyen *et al.* (2005) também relataram a diminuição dos teores de gordura de kefir durante a estocagem. O desenvolvimento de micro-organismos lipolíticos nos produtos é atribuído como a principal causa dessa redução. Como demonstrado na quantificação de ácidos graxos livres deste estudo, em todos os tratamentos (B7, D1, M e YA) foi observada a capacidade dos lactobacilos aumentarem os teores de ácidos graxos livres, sugerindo a ocorrência do processo de lipólise nos produtos.

Teores equivalentes de gordura foram encontrados em outras análises desse componente em leites fermentados de cabra (Bessa *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns trabalhos observaram teores mais elevados de gordura, chegando à concentração de 5,37g/100g (Eissa *et al.*, 2010; Salva *et al.*, 2011; Ranadheera *et al.*, 2016). Diferenças entre os valores encontrados podem ocorrer devido a vários fatores relacionados à matéria-prima (leite de cabra), uma vez que a gordura é o componente lácteo mais sujeito a oscilações, que ocorrem em função da raça do animal, idade, número de partos, estágio de lactação, estação do ano, clima e nutrição (Chilliard *et al.*, 2014; Inglingstad *et al.*, 2014). Além disso, durante as etapas de produção dos leites fermentados foram acidiconados 8% de sacarose, exercendo um efeito diluidor entre os demais componentes do leite, incluindo a gordura. Esse efeito também foi observado no trabalho de Ranadheera *et al.* (2016), no qual verificou-se uma diminuição na concentração dos componentes do produto à medida em que aumentava-se a quantidade de polpas de frutas acrescida em iogurtes de leite de cabra.

Baseado nos teores de proteína encontrados (Tabela 20), é possível perceber que nenhuma amostra, independentemente do tratamento ou período de refrigeração, apresentou o valor mínimo de 2,9g/100g estabelecido pela legislação (Brasil, 2007). Porém, o próprio RTIQ ressalta que os leites fermentados podem apresentar teores de gordura e proteína inferiores ao preconizado quando adicionados de agregados, açucarados e/ou saborizados. Dessa forma, como os leites fermentados foram produzidos acrescentando-se 8% de sacarose, esperava-se um efeito diluidor dos outros componentes sólidos do produto, incluindo as proteínas. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao teor desse componente, sendo o tempo de armazenamento o único fator que contribuiu para essa diferença.

Ahmed e Razig (2017) relataram a influencia da degradação de aminoácidos pela cultura fermentadora e do processo de hidrólise de caseínas a peptídeos hidrofóbicos na diminuição da concentração de proteínas ao longo do período de estocagem de iogurte.

Tabela 20: Teor de proteína dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Proteína (g/100g)			
	B7	D1	M	YA
0	2,73A ± 0,16	2,85A ± 0,10	2,83A ± 0,04	2,78A ± 0,13
15	2,64A ± 0,14	2,60B ± 0,11	2,69B ± 0,10	2,64B ± 0,17
30	2,50B ± 0,17	2,57B ± 0,09	2,55C ± 0,06	2,55B ± 0,11

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey (p<0,05).

Por outro lado, na maioria dos trabalhos sobre avaliação da qualidade físico-química de leites fermentados de cabra é observado um maior teor de proteínas, variando de 3,51 a 5,39g/100g (Martín-Diana *et al.*, 2003; Eissa *et al.*, 2010; Salva *et al.*, 2011; Bessa *et al.*, 2016; Ranadheera *et al.*, 2016). Novamente, essas diferenças podem ocorrer, principalmente, devido à qualidade das matérias primas, ou seja, do leite de cabra utilizado. Além disso, em alguns trabalhos houve a adição de proteínas do soro ao leite, culminando na maior concentração desse composto no produto final.

O teor de sólidos totais dos leites fermentados produzidos (Tabela 21) não se alterou em função do fermento utilizado, apresentando diferenças significativas apenas de acordo com o período de estocagem. Diminuições dos teores de proteína, gordura e sólidos totais ao longo do período de estocagem dos leites fermentados de cabra também foram observados no estudo de Eissa *et al.* (2010).

Tabela 21: Teor de extrato seco total dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	EST (g/100g)			
	B7	D1	M	YA
0	17,93A ± 0,45	17,88AB ± 0,19	18,05A ± 0,35	18,02A ± 0,41
15	18,17A ± 0,77	18,31A ± 0,63	18,30A ± 0,32	18,22A ± 0,56
30	17,05B ± 0,20	17,39B ± 0,36	17,29B ± 0,21	17,33B ± 0,28

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey (p<0,05).

Relatos na literatura científica indicaram teores de extrato seco total muito variável entre os leites fermentados de cabra. Em geral, esses valores oscilaram de 11,5 até 18,9g/100g (Park, 1994; Martín-Diana *et al.*, 2003; Eissa *et al.*, 2010; Bessa *et al.*, 2016; Ranadheera *et al.*, 2016). A grande variação observada quanto a esse parâmetro se deve às diferenças entre o teor de sólidos dos leites de cabra utilizado como matéria prima, bem como aos diferentes processos de produção do leite fermentado, pois alguns se caracterizam pela adição de componentes sólidos como polpas de fruta, açúcar e proteína do soro concentrado.

Ao longo do período de armazenamento das amostras a 7°C, foi constatada a diminuição significativa dos teores de sólidos totais, refletindo as reduções já abordadas das concentrações de gordura e proteína observadas durante a estocagem dos leites fermentados.

Embora a análise estatística demonstre algumas diferenças entre o teor de cinzas ao longo do período de estocagem dos leites fermentados a 7°C (Tabela 22), numericamente a diferença observada entre as médias é praticamente inexpressiva, pois se trata da concentração de um componente em 100g do produto.

Tabela 22: Teor de cinzas dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Cinzas (g/100g)			
	B7	D1	M	YA
0	0,69B ± 0,02	0,70B ± 0,02	0,68B ± 0,03	0,68B ± 0,02
15	0,73A ± 0,03	0,73A ± 0,03	0,72A ± 0,03	0,72A ± 0,02
30	0,73A ± 0,03	0,72AB ± 0,03	0,71A ± 0,03	0,71AB ± 0,04

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tükey (p<0,05).

Na literatura científica, é possível encontrar teores de resíduos minerais variando de 0,75 a 1,39g/100g. Os valores mais altos que os encontrados nesse estudo novamente podem se dever ao efeito de diluição pela adição de açúcar ou efeito de concentração pela adição de proteínas do soro que também contém minerais em sua composição (Martín-Diana *et al.*, 2003; Eissa *et al.*, 2010; Salva *et al.*, 2011; Bessa, 2014; Ranadheera *et al.*, 2016). Por outro lado, Park (1994) encontrou teores de cinzas aproximados aos obtidos nesse estudo ao analisar leites fermentados de cabra comerciais produzidos nos Estados Unidos.

5.3.4. Parâmetros microbiológicos durante a estocagem

As pesquisas de micro-organismos patogênicos ao longo de todo período de estocagem apresentaram resultados que demonstraram a ausência de coliformes a 30°C e 45°C, bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase-positivo e *Salmonella* spp.. Dessa forma, os leites fermentados se mostraram adequados quanto aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 46 (Brasil, 2007) e pela Resolução da Diretoria Colegiada número 12 – RDC nº 12 (Brasil, 2001), sendo, portanto, aptos e seguros para serem fornecidos ao público para a avaliação sensorial.

A enumeração das bactérias ácido-lácticas nos leites fermentados de cabra ao longo do período de estocagem a 7°C pode ser observada na figura 9.

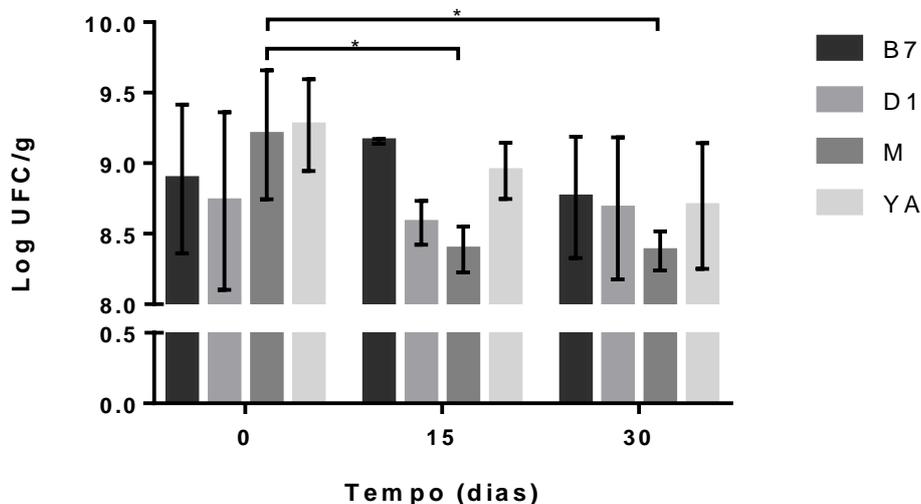


Figura 9. Contagem de *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA nos leites fermentados e armazenados a 7°C por 0, 15 e 30 dias. Teste de Tükey ($p < 0,05$).

Independentemente do tratamento e do período de estocagem dos produtos, foi observado uma contagem de lactobacilos superior a 10^8 UFC/g, que além de atender os requisitos estabelecidos pela legislação, também se adequa aos valores encontrados em produtos contendo probióticos (Tamime *et al.*, 2005; Brasil, 2007; Hill *et al.*, 2014). Além disso, os micro-organismos mostraram uma viabilidade constante ao longo de todo período, visto que não houve diferença significativa entre as contagens dos lactobacilos nos dias 0, 15 e 30, com exceção do tratamento M. Neste caso, a contagem foi estatisticamente maior no início do período de estocagem, demonstrando uma queda considerável no dia 15 que se manteve até o final. O resultado contrasta com a resposta de ambas as bactérias que compõem o tratamento M (B7 e D1) no teste *spot on the lawn*, no qual um lactobacilo não foi capaz de antagonizar *in vitro* o crescimento do outro. Mesmo com a diminuição da concentração de lactobacilos no leite M, esse produto continuou apresentando valores desejáveis do ponto de vista legal e contagens superiores a 10^8 UFC/g.

Comparado aos outros estudos, os lactobacilos demonstraram estabilidade superior, visto que foi observada, de uma forma geral, a perda de até 1 log na contagem dos *Lactobacillus* spp. em leites fermentados de cabra nos trabalhos de Martín-Diana *et al.* (2003), Eissa *et al.* (2010), Bessa (2014) e Ranadheera *et al.* (2016). No trabalho de Santos *et al.* (2017), foi observado que, apesar das contagens apresentarem valores inferiores, a viabilidade de *L. rhamnosus* se manteve nos sete primeiros dias de estocagem (7,38 log UFC/g) e apresentou considerável aumento até o dia 28 (7,78 log UFC/g).

5.3.5. Análise sensorial dos leites fermentados

As médias de pontuação atribuídas aos leites fermentados, seguindo escala hedônica de cinco pontos e a intenção de compra dos provadores estão retratadas nas tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 23: Aceitação de leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Aceitação (pontuação na escala hedônica)			
	B7	D1	M	YA
15	3,28Aab ± 1,09	3,54a ± 1,08	3,14b ± 1,08	3,54Aa ± 1,12
30	2,91Bb ± 1,23	3,53a ± 1,06	2,99b ± 1,14	3,13Bb ± 1,14

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste t ($p < 0,05$) e teste de Tükey ($p < 0,05$) respectivamente.

Baseado nas notas atribuídas é possível perceber uma maior aceitação dos leites fermentados B7, D1 e YA comparado ao tratamento M, considerando 15 dias de armazenamento a 7°C. Com 30 dias de estocagem, foram atribuídas notas significativamente menores para B7 e YA, fazendo com que D1 se destacasse sobre todos os outros produtos, visto que M manteve um grau de aceitação estatisticamente menor como visto na análise com 15 dias.

Segundo observações registradas pelos próprios provadores na ficha de avaliação, o leite fermentado M com 15 dias de armazenamento, apresentava um sabor característico de produtos caprinos, sendo esse um fator que pode ter contribuído para a menor aceitação frente aos outros tratamentos. Uma lipólise mais acentuada poderia explicar tal percepção pelos provadores, entretanto não houve diferença significativa entre a concentração de ácidos graxos livres do leite M e dos demais tratamentos. Além disso, a textura foi outro ponto ressaltado pelos provadores, cujos relatos indicaram uma maior fluidez do leite M. Todavia, o padrão comparativo utilizado pelos provadores foram os leites fermentados comerciais, que são adicionados de aditivos que afetam positivamente a percepção da textura desses produtos. Martín-Diana *et al.* (2003) também observaram menores pontuações de aceitação de leites fermentados de cabra quando esses apresentavam características de fluidez mais acentuadas. Nesse caso, o produto pior avaliado demonstrou menores valores de viscosidade e firmeza, além de maior grau de sinérese. Da mesma forma, no trabalho de Ranadheera *et al.* (2016) foi observado que a textura e o sabor de iogurtes produzidos com leite de cabra foram os fatores determinantes para as diferenças observadas entre a avaliação geral de distintos tratamentos.

Com 30 dias de refrigeração, o leite fermentado M manteve as mesmas características sensoriais já descritas. Além disso, relatos dos provadores indicaram o mesmo perfil nos produtos B7 e YA, o que poder ter contribuído para a menor pontuação final desses tratamentos. Os principais registros indicavam alterações da textura e principalmente do sabor, comparando o paladar desses leites fermentados aos de soro e queijos.

O sabor de soro é indicativo do aumento da sinérese do produto ao longo do período de estocagem, como observado em outros trabalhos, os quais mostraram que o período de maior dessoragem coincidiu com as menores pontuações dos produtos em análises sensoriais (Ranadheera *et al.*, 2016). Ainda nesse contexto, o sabor característico de queijo relatado por alguns provadores sugere a ocorrência de proteólise. Essa reação bioquímica é o principal evento que ocorre durante maturação de queijos, contribuindo para a formação do sabor próprio desse produto pela liberação de peptídeos e aminoácidos resultantes da quebra de proteínas. A proteólise pode ser desencadeada por vários fatores, dentre os quais se destaca a atividade de enzimas de origem bacterianas, incluindo as produzidas por BAL (Sousa *et al.*, 2001; McSweeney, 2004). A atividade proteolítica de *L. casei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foi demonstradas em outros estudos, sendo essa reação também observada durante a fermentação do leite

de cabra (Salva *et al.*, 2011; Vukotić *et al.*, 2016). Além disso, no trabalho de Hernandez *et al.* (2015) foi demonstrada uma maior tendência do leite fermentado de cabra em apresentar proteólise durante o período de estocagem quando comparado ao análogo bovino.

As menores notas atribuídas aos leites fermentados com 30 dias de armazenamento também coincidem com o período em que foi detectada uma maior concentração de ácidos graxos livres, que embora não tenham influenciado a aceitação de D1, pode ter contribuído para a redução dos valores dos demais tratamentos pela mudança de sabor que esses compostos podem promover (Jia *et al.* 2016).

Considerando a escala hedônica de cinco pontos utilizada nessa análise, é possível perceber que a maioria das médias obtidas apresentam valores situados entre as notas 3 e 4, que significam respectivamente “não gostei nem desgostei” e “gostei”. Apenas as médias dos tratamentos B7 e M com 30 dias de estocagem apresentaram valor entre 2 (“não gostei”) e 3. Esses resultados mostram uma avaliação superior as observadas no estudo de Ranadheera *et al.* (2016), no qual as médias de aceitação dos leites fermentados caprinos oscilaram entre “desgostei moderadamente” e “não gostei nem desgostei” em uma escala de 9 pontos. Seguindo a mesma escala, Bessa *et al.* (2016) encontraram médias entre “desgostei levemente” e “gostei muito” na avaliação de sabor, aroma e viscosidade. No trabalho de Santos *et al.* (2017) foi observada uma pontuação de 7 (“gostei levemente”) para leites fermentado de cabra por *L. rhamnosus*. Martín-Diana *et al.* (2003) observaram uma pontuação média de 4,7 para o leite fermentado de cabra em uma escala de 10 pontos, sendo que a aceitação do produto aumentou para 8,1 quando se adicionou proteínas do soro concentrado na formulação do produto.

Dutcosky (1996), citado por Emediato *et al.* (2009), propôs que uma aceitável repercussão em testes sensoriais seria obtida quando o índice de aceitabilidade das amostras (IA) fosse igual ou superior a 70%. Este índice é obtido pela relação entre a pontuação média obtida no teste vezes 100, dividida pela nota máxima obtida no quesito (no teste de aceitação). Dessa forma, fazendo os cálculos para os leites fermentados de cabra, observa-se que, com 15 dias de armazenagem a 7°C, os leites fermentados por D1 e YA foram os únicos a apresentarem índices maiores de 70%. Com 30 dias, apenas D1 continuou apresentando índice nessa faixa, comprovando a superioridade sensorial do tratamento comparado à B7, M e YA.

De acordo com a tabela 24, o leite fermentado D1 também apresentou-se superior aos demais produtos quanto a intenção de compra, tanto com 15 como com 30 dias de estocagem, sendo que esses dias não exerceram qualquer efeito sobre esse parâmetro. Nos leites fermentados por B7 e YA, foi observada uma diminuição significativa da intenção de compra entre os períodos, sendo que M permaneceu estatisticamente na mesma faixa ao longo dos 30 dias, refletindo os resultados encontrados na avaliação da aceitação dos produtos.

Tabela 24: Intenção de compra dos leites fermentados de cabra por *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, ambos (M) e *L. casei* YA em diferentes dias de estocagem a 7°C

Dias de estocagem	Intenção de compra (%)			
	B7	D1	M	YA
15	49,05Ab	60,00a	45,71b	58,10Ab
30	39,52Bb	60,66a	38,10b	44,29Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

Os valores apresentados pela amostra D1 são maiores que os encontrados no trabalho de Garcia e Travassos (2012), no qual a intenção de compra pelos provadores de leites fermentados de cabra variou de 30,95% a 42,86%. Por outro lado, Alves *et al.* (2009) observaram uma intenção de compra aproximada (61%) para *frozen yogurt* produzidos com leite de cabra adicionados de probióticos.

No trabalho de Oliveira (2016), a avaliação do leite de búfala fermentado por D1 por provadores mostrou uma intenção de compra semelhante ao encontrado no caprino, sendo de 63,40% e 63,16% nos dias 14 e 28 de estocagem. Por outro lado, o produto bubalino fermentado por B7 apresentou uma intenção de comprar maior (60,13% e 62,50%) que o encontrado no leite fermentado de cabra. Acurcio (2016) encontrou valores aproximados na avaliação de leite fermentado de vaca por B7 armazenado por 15 dias, já que 45% dos provadores demonstraram intenção de compra para esse produto.

Baseado nos resultados obtidos na análise sensorial dos leites fermentados de cabra, o produto adicionado de *L. rhamnosus* D1 reuniu a melhor aceitação pelo público e maior percentual de intenção de compra. Por esses motivos, ele pode ser considerado o melhor fermento, dentre os testados, para produção de leites fermentados de cabra.

6. CONCLUSÃO

Lactobacillus plantarum B7 e *L. rhamnosus* D1 tiveram um satisfatório desempenho nas avaliações de potencial probiótico *in vitro*, com base na sensibilidade a antimicrobianos e na tolerância ao ácido gástrico artificial e aos sais biliares, sugerindo uma resistência às fontes de injúrias naturalmente presentes no trato gastrointestinal dos hospedeiros.

Além disso, as duas amostras foram capazes de antagonizar, em meio de cultura, o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, sugerindo que o emprego das mesmas em produtos funcionais possa ser indicado.

Por outro lado, nos testes *in vivo* não foi observado um efeito protetor aparente de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 quanto à sobrevivência de camundongos BALB/c após infecção experimental por *L. monocytogenes*, embora o grupo tratado com D1 tenha apresentado maior desenvolvimento ponderal no pré-tratamento e após o desafio, indicando possível melhor efeito protetor desta BAL.

Os leites fermentados de cabra produzidos a partir da inoculação de B7, D1, ambas (M) e *L. casei* (YA - controle positivo) apresentaram padrões físico-químicos adequados durante a estocagem por 30 dias sob temperatura de 7°C, considerando a legislação brasileira vigente para leites fermentados e trabalhos científicos sobre a fermentação de leite de cabra. Além disso, durante todo o período, as amostras foram isentas de micro-organismos patogênicos (coliformes a 30°C e 45°C, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. e bolores e leveduras) e mantiveram a população de bactérias lácticas em uma concentração desejável ($> 10^8$ UFC/g).

Na análise sensorial, o leite fermentado de cabra por D1 apresentou maior aceitação e intenção de compra ($p>0,05$) que os demais tratamentos.

Portanto, pelo desempenho observado na avaliação ponderal de camundongos BALB/c e na avaliação sensorial de leites fermentados de cabra, sugere-se que *L. rhamnosus* D1 seja o micro-organismo mais interessante quanto à utilização como probiótico e como cultura para obtenção de leite fermentado de cabra.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, E.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, H. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. *Food Sci. Technol.*, v. 73, p. 205-211, 2016.
- ABRIOUEL, H.; MUÑOZ, M. D. C. C.; LERMA, L. L. *et al.* New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Res. Int.*, v. 78, p. 465-481, 2015.
- ABUJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; OSUJI, C. M. Functional components and medicinal properties of food: a review. *J. Food Sci. Technol.*, v. 52, n. 5, p. 2522-2529, 2015.
- ACURCIO L. B. *Efeito protetor de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal na infecção experimental com Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium*. 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ACURCIO, L. B.; SANDES, S. H. C.; BASTOS, R. W. *et al.* Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. *Benef. Microbes*, v. 8, n. 4, p. 579-588, 2017.
- ACURCIO, L. B.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al.* Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 3, p. 940-948, 2014.
- AHMED, J. A. O.; RAZIG, K. A. A. Effect of Levels of Buttermilk on Quality of Set Yoghurt. *J. Nutr. Food Sci.*, v. 7, n. 634, p. 2, 2017.
- AHMED, O. M.; PANGLOLI, P.; HWANG, C. A. *et al.* The occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail ready-to-eat meat and poultry products related to the levels of acetate and lactate in the products. *Food Control*, v. 52, p. 43-48, 2015.
- AIBA, Y.; ISHIKAWA, H.; TOKUNAGA, M. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No. 1088. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 364, n. 11, 2017.
- AIBA, Y.; NAKANO, Y.; KOGA, Y. *et al.* A highly acid-resistant novel strain of *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 has antibacterial activity, including that against *Helicobacter pylori*, and inhibits gastrin-mediated acid production in mice. *Microbiologyopen*, v. 4, n. 3, p. 465-474, 2015.
- ALVES, L. D. L.; RICHARDS, N. S. P. D. S.; BECKER, L. V. *et al.* Aceitação sensorial e caracterização de *frozen yogurt* de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico. *Ciênc. Rural*, v. 39, n. 9, 2009.
- AMANI, E.; ESKANDARI, M. H.; SHEKARFOROUSH, S. The effect of proteolytic activity of starter cultures on technologically important properties of yogurt. *Food Sci. Nutr.*, v. 5, n. 3, p. 525-537, 2017.
- ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, v. 4, n. 1, p. 106-122, 2004.

- ARCURI, E. F.; DA SILVA, P. D. L.; BRITO, J. R. F. *et al.* Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. *Ciênc. Rural*, v. 34, n. 5, p. 1497-1500, 2004.
- ARENA, M. P.; FIOCCO, D.; MASSA, S. *et al.* *Lactobacillus plantarum* as a strategy for an *in situ* production of vitamin B2. *J. Food Nutr. Disor.*, v. 4, p. 2, 2014.
- ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; LANGA, S. *et al.* Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *Biomed Res. Int.*, v. 2015, 2015.
- ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutr.*, v. 29, n. 4, p. 591-596, 2013.
- BAKARCIC, D.; JOKIC, N. I.; HRVATIN, S. *et al.* The use of Probiotics in Dental Medicine. *Madridge J. Dent. Oral Surg.*, v. 1, n. 1, p. 46-48, 2017.
- BALASHOV, S. V.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E. *et al.* Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 78, n. 4, p. 321-327, 2014.
- 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, n. 6, p. 663-667, 2007.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. *Yeast*, v. 16, n. 8, p. 755-771, 2000.
- BECATTINI, S.; LITTMANN, E. R.; CARTER, R. A. *et al.* Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.*, v. 214, n. 7, p. 1973-1989, 2017.
- BENDALI, F., HEBRAUD, M., SADOON, D. Anti-bacterial and anti-adherence activities of a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, v. 2, p. 52-63, 2014.
- BENTLEY Instrument INC. Bactocount 150 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 2002. 49p.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; AUBRY, C.; MOTTA, J. P. *et al.* Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 278-283, 2013.
- BESSA, M. E. *Percepção sensorial e aceitação do leite de cabra fermentado*. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Univerisade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora.
- BESSA, M. E. D.; RODARTE, M. P.; OTENIO, M. H. *et al.* Sensory perception of the fermented goat milk: potential application of the DSC method. *Food Sci. Technol.*, v. 36, n. 3, p. 406-412, 2016.
- BILLE, J.; ROCOURT, J. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H. *et al.* (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington D. C.: ASM, v. 1, n. 33, p. 461-471, 2013.

- BORGES, M. D. F.; de ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E. F. *et al.* *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. *Embrapa Agroindústria Tropical*. Documentos, 2009.
- BOZANIK, R.; TRATNIK, L. Quality of cow's and goat's fermented bifido milk during storage. *Proteins*, v. 3, p. 2.25, 2001.
- BRANT, L. M F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 8 de novembro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. . Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006b.
- BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica (1th ed.). Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos de Alimentos. Brasília: Ministério de Saúde, 2001.
- BRASIL. Presidência da República. Lei 11.346 de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas a assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. Brasília: Presidência da República, 2006a.
- BUJALANCE, C.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; MORENO, E. *et al.* Lack of correlation between *in vitro* antibiosis and *in vivo* protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. *Res. Microbiol.*, v. 165, n. 1, p. 14-20, 2014.
- BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 21-27, 1997.
- CABANES, D.; DUSSURGET, O.; DEHOUX, P. *et al.* Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol. Microbiol.*, v. 51, n. 6, p. 1601-1614, 2004.
- CAMPION, A.; CASEY, P. G.; FIELD, D. *et al.* *In vivo* activity of nisin A and nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC Microbiol.*, v. 13, n. 1, p. 23, 2013.

CAMPION, A.; MORRISSEY, R.; FIELD, D. *et al.* Use of enhanced nisin derivatives in combination with food-grade oils or citric acid to control *Cronobacter sakazakii* and *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol.*, v. 65, p. 254-263, 2017.

CAMPO, R.; GARRIGA, M.; PÉREZ-ARAGÓN, A. *et al.* Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: a double blind prospective study. *J. Cyst. Fibros.*, v. 13, n. 6, p. 716-722, 2014.

CANDELA, M.; PERNA, F.; CARNEVALI, P. *et al.* Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 125, n. 3, p. 286-292, 2008.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y. *et al.* Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis?. *Epidemiol. Infect.*, v.130, n.1, p.79-86, 2003.

CARTWRIGHT, E. J.; JACKSON, K. A.; JOHNSON, S. D. *et al.* Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2013.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016.

CDC. Centers of Disease Control and Prevention. Foodborne outbreak online database. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks>>. Acesso em: 06 dez. 2017.

CEAN, A.; STEF, L.; SIMIZ, E. *et al.* Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 12, n. 2, p. 122-130, 2015.

CHALITA, M.A.N.; SILVA, R.O.P.; PETTI, R.H.V. *et al.* Algumas Considerações sobre a fragilidade de concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. *Info. Econ.*, v.39, n.6, 2009.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I. *et al.* Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Int. J. Food Microbiol.*, v.116, n.1, p.52-63, 2007

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L. *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998a.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. *et al.* Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, v.84, p.759- 768, 1998b.

CHEN, H.; HUI, Y.; CHEN, L. *et al.* Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on antioxidant activity from fermented goat milk. *Carpathian J. Food Sci. Technol.*, v. 7, n. 2, 2015.

- CHILLIARD, Y.; TORAL, P. G.; SHINGFIELD, K. J. *et al.* Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Rumin. Res.*, v. 122, n. 1, p. 31-37, 2014.
- CHOI, H. J.; LEE, N. K.; PAIK, H. D. Health benefits of lactic acid bacteria isolated from kimchi, with respect to immunomodulatory effects. *Food Sci. Biotechnol.*, v. 24, n. 3, p. 783-789, 2015.
- COGGINS, P. C.; ROWE, D. E.; WILSON, J. C. *et al.* Storage and temperature effects on appearance and textural characteristics of conventional milk yogurt. *J. Sens. Stud.*, v. 25, n. 4, p. 549-576, 2010.
- CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M. *et al.* Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 64, n. 1, p. 95-104, 2001.
- COSTA, G. N.; MIGLIORANZA, L. H. Probiotics: the effects on human and current prospects. In: RIGOBELLO, E. C. (Ed). *Probiotics*. 3 Ed. Croácia: InTech, 2012. p. 367-384.
- 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.
- COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; FRANCO, R. M. *et al.* Changes on expected taste perception of probiotic and conventional yogurts made from goat milk after rapidly repeated exposure. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 5, p. 2610-2618, 2014.
- COSTA, M. P.; SILVA FRASAO, B.; COSTA LIMA, B. R. C. *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta*, v. 152, p. 162-170, 2016.
- COSTA, W. K. A.; SOUZA, E. L.; BELTRÃO-FILHO, E. M. *et al.* Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e93361, 2014.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.
- COUSIN, F. J.; LYNCH, S. M.; HARRIS, H. M. *et al.* Detection and genomic characterization of motility in *Lactobacillus curvatus*: confirmation of motility in a species outside the *Lactobacillus salivarius* clade. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, n. 4, p. 1297-1308, 2015.
- DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J. *et al.* An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, v.336, n.2, p.100-105, 1997.
- DAMIN, M. R.; MINOWA, E.; ALCANTARA, M. R. *et al.* Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *J. Texture Stud.*, v. 39, n. 1, p. 40-55, 2008.
- DEETH H. C.; FITZ-GERALD, H. C.; WOOD, A. F. A. A convenient method for determining the extend of lipolysis in milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.30, p.109-111, 1975.
- DELCOUR, J.; FERAIN, T.; DEGHOAIN, M. *et al.* The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 76, n. 1-4, p. 159-184, 1999.

- DELGADO, S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 202-207, 2005.
- DELGADO, S.; LEITE, A. M.; RUAS-MADIEDO, P. *et al.* Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front. Microbiol.*, v. 5, p. 766, 2015.
- DEVIRGILIIS, C.; ZINNO, P.; PEROZZI, G. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front. Microbiol.*, v. 4, 2013.
- DICKS, L. M.; BOTHA, M.; LOOS, B. *et al.* Adhesion of *Lactobacillus reuteri* strain Lr1 to equine epithelial cells and competitive exclusion of *Clostridium difficile* from the gastro-intestinal tract of horses. *Ann. Microbiol.*, v. 65, n. 2, p. 1087-1096, 2015.
- DIRIENZO, D. B. Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. *Nutr. Rev.*, v. 72, n. 1, p. 18-29, 2014.
- DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J. R. (Ed.). *Foodborne disease handbook*. 2nd ed. New York: M. Dekker, v.1, n. 10, p.213-246, 2001.
- DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Rev. Bras. Agropec. Sustent.*, v.2, n.2., p.26-34, 2012.
- D'ORAZIO, S. E. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 4, 2014.
- DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, v. 34, n. 3, p. 483-498, 2005.
- DORTET, L.; MOSTOWY, S.; LOUAKA, A. S. *et al.* Recruitment of the major vault protein by InlK: a *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog.*, v. 7, n. 8, p. e1002168, 2011.
- DUPONT, H. L.; ERICSSON, C. D. Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, v. 328, n. 25, p. 1821-1827, 1993.
- DUTCOSKY, S. D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: *Champagnat*. 1996. 123p. *apud* MEDIATO, R. M. S.; SIQUEIRA, E. R.; STRADIOTTO, M. M. *et al.* Queijo tipo prato de leite de ovelhas alimentadas com dietas contendo gordura protegida. *Vet. Zootec.*, v.16, n.1, p. 228-238, 2009.
- EISSA, E. A.; AHMED, I. M.; YAGOUB, A. E. A. *et al.* Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of yoghurt produced from goat milk. *Livestock Res. Rural Dev.*, v. 22, n. 8, p. 281-286, 2010.
- EL-GHAISH, S.; AHMADOVA, A.; HADJI-SFAXI, I. *et al.* Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 22, n. 9, p. 509-516, 2011.
- EL-HATMI, H.; JRAD, Z.; SALHI, I. *et al.* Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow milk. *Mljekarstvo*, v. 65, n. 3, 2015.

- EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 47, n. 2, p. 590-592, 1997.
- FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London: FAO/WHO, 2002. 11p.
- FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.
- FARIAS A. G. M. M.; OZELAME, S. B.; SCHMITT, B. H. E. *et al.* Avaliação da acidez de diversas marcas de leite fermentado disponíveis comercialmente. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clin. Integr.*, v. 12, n. 4, 2012.
- FARVIN, K. S.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S. *et al.* Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2–Characterisation of peptide fractions. *Food Chem.*, v. 123, n. 4, p. 1090-1097, 2010.
- FERNANDES, C. F.; SHAHANI, K. M.; AMER, M. A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 46, n. 3, p. 343-356, 1987.
- FHOULA, I.; NAJJARI, A.; TURKI, Y. *et al.* Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *Biomed Res. Int.*, v. 2013, 2013.
- FIGUEIREDO, N. C. *Leite de cabra: diagnóstico de qualidade na mesorregião da Zona da Mata mineira e estudo da das alterações do leite armazenado por sete dias em condições laboratoriais*. 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FIOCCHI, A.; PECORA, V.; DAHDAH, L. Probiotics, Prebiotics & Food allergy Prevention: Clinical Data in Children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 63, n. 1S, p. S14-S17, 2016.
- FISBERG, M.; MACHADO, R. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutr. Rev.*, v. 73, n. suppl_1, p. 4-7, 2015.
- FONG, F. L. Y.; SHAH, N. P.; KIRJAVAINEN, P. *et al.* Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *Int. Rev. Immunol.*, v. 35, n. 3, p. 179-188, 2016.
- FOSTER, J. A.; NEUFELD, K. A. M. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.*, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.
- FRIZZO, L. S.; ZBRUN, M. V.; SOTO, L. P. *et al.* Protective effect of an inoculum of lactic acid bacteria from bovine origin against *Salmonella* serotype Dublin in the intestinal tract of mice. *J. Anim. Vet. Adv.*, v. 9, n. 16, p. 2113-2122, 2010.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* v.66. p. 65–378, 1989.
- GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.*, v.98, n.6, p.1345-1353, 2005.

- GARCIA, E. F.; LUCIANO, W. A.; XAVIER, D. E. *et al.* Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1371, 2016.
- GARCIA, G. R. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v. 101, p. 263 - 268, 2006.
- GARCIA, R. V.; TRAVASSOS, A. E. R. Leite fermentado caprino sabor umbu: elaboração e aceitabilidade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 71, n. 1, p. 134-139, 2012.
- GARRIGA, M.; RUBIO, R.; AYMERICH, T. *et al.* Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Benef. Microbes*, v. 6, n. 3, p. 337-343, 2014.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed., 2005.
- GAUDREAU, H.; CHAMPAGNE, C. P.; JELEN, P. The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 36, n. 1, p. 83-90, 2005.
- GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C. *et al.* Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 56, n. 8, p. 1262-1274, 2016.
- GIANFRANCESCHI, M.; GATTUSO, A.; TARTARO, S. *et al.* Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. *Eur. J. Epidemiol.*, v.18, n.10, p.1001-1006, 2003.
- GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J. *et al.* Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.*, v. 83, n. 2, p. 167-176, 2000.
- GORISSEN, D. M.; RUTTEN, N. B. M. M.; OOSTERMEIJER, C. M. *et al.* Preventive effects of selected probiotic strains on the development of asthma and allergic rhinitis in childhood. The Panda study. *Clin. Exp. Allergy*, v. 44, n. 11, p. 1431-1433, 2014.
- GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J. *et al.* World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics october 2011. *J. Clin. Gastroenterol.*, v. 46, n. 6, p. 468-481, 2012.
- GUIMARÃES, A. S. *Caracterização da caprinocultura em Minas Gerais*. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- GÜLER, Z.; GÜRSOY-BALCI, A. C. Evaluation of volatile compounds and free fatty acids in set types yogurts made of ewes', goats' milk and their mixture using two different commercial starter cultures during refrigerated storage. *Food Chem.*, v. 127, n. 3, p. 1065-1071, 2011.
- GUO, X.; LONG, R.; KREUZER, M. *et al.* Importance of functional ingredients in yak milk-derived food on health of Tibetan nomads living under high-altitude stress: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 54, n. 3, p. 292-302, 2014.

- HALDER, D.; SHYAMAPADA, M. Antibacterial potentiality of commercially available probiotic lactobacilli and curd lactobacilli strains, alone and in combination, against human pathogenic bacteria. *Transl. Biomed.*, v. 7, n. 2, 2016.
- HARDY, J. W.; LEVASHOVA, Z.; SCHMIDT, T. L. *et al.* [99mTc] Annexin V-128 SPECT Monitoring of Splenic and Disseminated Listeriosis in Mice: a Model of Imaging Sepsis. *Mol. Imaging Biol.*, v. 17, n. 3, p. 345-354, 2015.
- HART, A. L.; LAMMERS, K.; BRIGIDI, P. *et al.* Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, v. 53, n. 11, p. 1602-1609, 2004.
- HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. In: *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*. InTech, 2013.
- HERNANDEZ, K.; JONES, J. O.; PARK, Y. W. Evaluation of lipolysis and proteolysis in commercial bovine and caprine milk yogurts compared with those of a university manufactured caprine milk yogurt during 4 weeks refrigerated storage. *Front. Food Sci. Technol.*, v. 2, p. 1-7, 2015.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v.11, p.506-514, 2014.
- HOELZER, K.; POUILLOT, R.; DENNIS, S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet. Res.*, v. 43, n. 1, p. 18, 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- IKEDA, D. M.; WEINERT JR, E.; CHANG, K. C. *et al.* Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. *Sustain. Agric.*, v. 8, p. 3-4, 2013.
- INGLINGSTAD, R. A.; STEINSHAMN, H.; DAGNACHEW, B. S. *et al.* Grazing season and forage type influence goat milk composition and rennet coagulation properties. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 6, p. 3800-3814, 2014.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: enumeration of somatic cell. IDF Standard 148A. Bruxelas: IDF, 1995. 8p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Whole milk: determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation midinfrared instruments. IDF Standard 141C. Bruxelas: IDF, 2000. 8p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. IDF Standard 117A. Bruxelas: IDF, 1988. 10p.
- IPHAN, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033> Notícia. Acesso em: 30 nov. 2017.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M. *et al.* Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chem.*, v. 90, n. 4, p. 613-620, 2005.

JAMES, L.; BEENA, A. K.; ANUPA, A. *et al.* Antibiogram of Lactobacilli Isolated from Four Different Niches. *J. Microbiol. Microb. Technol.*, v. 1, n. 1, p. 4, 2016.

JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 7 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2005. 635p.

JESUS, A. L. T.; FERNANDES, M. S.; KAMIMURA, B. A. *et al.* Growth potential of *Listeria monocytogenes* in probiotic cottage cheese formulations with reduced sodium content. *Food Res. Int.*, v. 81, p. 180-187, 2016.

JIA, R.; CHEN, H.; CHEN, H. *et al.* Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 1, p. 221-227, 2016.

JOHNSTON, B. C.; GOLDENBERG, J. Z.; PARKIN, P. C. Probiotics and the prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants and children. *Jama*, v. 316, n. 14, p. 1484-1485, 2016.

JOIN-LAMBERT, O. F.; EZINE, S.; LE MONNIER, A. *et al.* *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell. Microbiol.*, v. 7, n. 2, p. 167-180, 2005.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M. *et al.* Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *J. Dairy Sci.*, v.87, n.9, p.2803-2812, 2004.

KANG, M. S.; LIM, H. S.; OH, J. S. *et al.* Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.*, v. 75, n. 2, p. ftx009, 2017.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.91, n.2 p.167-174, 2004.

KHODER, G.; AL-MENHALI, A. A.; AL-YASSIR, F. *et al.* Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer. *Exp. Ther. Med.*, v. 12, n. 1, p. 3-17, 2016.

KIVIT, S.; TOBIN, M. C.; FORSYTH, C. B. *et al.* Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: implications for pro-and prebiotics. *Front. Immunol.*, v. 5, p. 60, 2014.

KLEIN, G.; HALLMANN, C.; CASAS, I. A. *et al.* Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.*, v. 89, n. 5, p. 815-824, 2000.

KOPELOFF, N.; BLACKMAN, N.; MCGINN, B. The incidence of *Lactobacillus acidophilus* in adults. *J. Infect. Dis.*, p. 426-429, 1932.

KUMAR, R.; DHANDA, S. Mechanistic Insight of Probiotics Derived Anticancer Pharmaceuticals: A Road Forward for Cancer Therapeutics. *Nutr. cancer*, v. 69, n. 3, p. 375-380, 2017.

LEE, B. B.; TOH, S. L.; RYAN, S. *et al.* Probiotics [LGG-BB12 or RC14-GR1] versus placebo as prophylaxis for urinary tract infection in persons with spinal cord injury [ProSCIUTTU]: a study protocol for a randomised controlled trial. *BMC Urol.*, v. 16, n. 1, p. 18, 2016.

- LEE, H. A.; KIM, H.; LEE, K. W. *et al.* Dead *Lactobacillus plantarum* stimulates and skews immune responses toward T helper 1 and 17 polarizations in RAW 264.7 cells and mouse splenocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, p. 469-76, 2016.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, v. 72, n. 4, p. 728–764, 2008.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.
- LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.
- LEITNER, G.; LAVON, Y.; MATZRAFI, Z. *et al.* Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *Int. Dairy J.*, v. 58, p. 9-13, 2016.
- LILLY, D. M.; STILLWEL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 471, n. 3659, p. 747–749, 1965.
- LIM, S. M.; JEONG, J. J.; JANG, S. E. *et al.* A mixture of the probiotic strains *Bifidobacterium longum* CH57 and *Lactobacillus brevis* CH23 ameliorates colitis in mice by inhibiting macrophage activation and restoring the Th17/Treg balance. *J. Funct. Foods*, v. 27, p. 295-309, 2016.
- LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W. *et al.* Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.*, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.
- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.*, v. 55, pt. 6, p. 645-659, 2006.
- LIU, D.; AINSWORTH, A. J.; AUSTIN, F. W. *et al.* Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J. Med. Microbiol.*, v. 52, n. 12, p. 1065-1070, 2003.
- LIU, Q.; NI, X.; WANG, Q. *et al.* *Lactobacillus plantarum* BSGP201683 isolated from giant panda feces attenuated inflammation and improved gut microflora in mice challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.*, v. 8, p. 1885, 2017.
- LLORENTE, C.; SCHNABL, B. Fast-track clearance of bacteria from the liver. *Cell Host Microbe*, v. 20, n. 1, p. 1-2, 2016.
- LOLLO, P. C.; MORATO, P. N.; MOURA, C. S. *et al.* Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Res. Int.*, v. 76, p. 611-617, 2015.
- LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed. New York: M. Dekker, n.6, p.131-224, 1999.
- LUKIC, J.; JANCIC, I.; MIRKOVIC, N. *et al.* *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus salivarius* differently modulate early immunological response of Wistar rats co-administered with *Listeria monocytogenes*. *Benef. Microbes*, v. 8, n. 5, p. 809-822, 2017.

- LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; SJÖBERG, A. M. *et al.* Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *J. Food Prot.*, v. 66, n. 11, p. 2062-2069, 2003.
- MACALUSO, G.; FIORENZA, G.; GAGLIO, R. *et al.* *In vitro* evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. *Ital. J. Food Saf.*, v. 5, n. 1, 2016.
- MACK, D. R.; MICHAEL, S.; WEI, S. *et al.* Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 276, n. 4, p. G941-G950, 1999.
- MANDEL, T. E.; CHEERS, C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect. Immun.*, v. 30, n. 3, p. 851-861, 1980.
- MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 5, p. 2578-2590, 2014.
- MARTEAU, P.; GERHARDT, M. F.; MYARA, A. *et al.* Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 8, n. 4, p. 151-157, 1995.
- MARTÍN, B.; PERICH, A.; GÓMEZ, D. *et al.* Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food microbiol.*, v. 44, p. 119-127, 2014.
- MARTÍN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELÁEZ, C. *et al.* Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, v. 13, n. 10, p. 827-833, 2003.
- MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *Br. J. Nutr.*, v. 114, n. 12, p. 1993-2015, 2015.
- MAURY, M. M.; TSAI, Y. H.; CHARLIER, C. *et al.* Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.*, v. 48, n. 3, p. 308, 2016.
- MAZIERO, M. T.; VIANA, C.; BERSOT, L. D. S. Microrganismos psicrotróficos lipolíticos em produtos lácteos durante o prazo comercial. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 65, n. 372, p. 10-17, 2010.
- MCFARLAND, L. V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin. Infect. Dis.*, v. 60, n. suppl_2, p. S85-S90, 2015.
- MCFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 12, n. 4, p. 193-207, 2000.
- MCSWEENEY, P. L. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.*, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

- MELLO, H. D.; MORAES, J. R.; NIZA, I. G. *et al.* Beneficial effects of probiotics on the intestine of juvenile Nile tilapia. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 33, n. 6, p. 724-730, 2013.
- MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.*, v. 67, p. 75-90, 2015.
- MENESES, J. N. C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil*. Dossiê interpretativo. Belo Horizonte: IPHAN, v. 1., 2006.
- MENG, J.; ZHU, X.; GAO, S. M. *et al.* Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 65, p. 110-114, 2014.
- NETTO, M. M. *A geografia do queijo minas artesanal*. 2011. 420 f. Tese (Doutorado em Geografia) — Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.
- METCHNIKOFF, E. *Prolongation of Life: Optimistic Studies*. New York: Putnam's Sons, 1908.
- MILLION, M.; ANGELAKIS, E.; PAUL, M. *et al.* Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.*, v. 53, n. 2, p. 100-108, 2012.
- MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 694 de 17 nov. 2004. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/276-portaria-no-694-de-17-de-novembro-de-2004>. Acesso em: 30 dez. 2017.
- MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Produtores de queijo Minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal>. Acesso em: 30 dez. 2017.
- MINERVINI, F.; BILANCIA, M. T.; SIRAGUSA, S. *et al.* Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiol.*, v. 26, n. 6, p. 559-564, 2009.
- MIREMADI, F.; AYYASH, M.; SHERKAT, F. *et al.* Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J. Funct. Foods*, v. 9, p. 295-305, 2014.
- MISHRA, C.; LAMBERT, J. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, v. 5, p. 20-24, 1996.
- MITCHELL, C.; FREDRICKS, D.; AGNEW, K. *et al.* Hydrogen-peroxide producing lactobacilli are associated with lower levels of vaginal IL1 β , independent of bacterial vaginosis. *Sex. Transm. Dis.*, v. 42, n. 7, p. 358, 2015.
- MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.
- MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. In: *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications*. Springer Netherlands, 1999. p. 185-198.

- MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J. *et al.* *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Foods*, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.
- MONTIJO-PRieto, S.; MORENO, E.; BERGILLOS-MECA, T. *et al.* A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. *Res. Microbiol.*, v. 166, n. 8, p. 626-632, 2015.
- MORENO, A. L.; CERVERA, R. P.; ORTEGA, A. R. *et al.* Scientific evidence about the role of yogurt and other fermented milks in the healthy diet for the Spanish population. *Nutr. Hosp.*, v. 28, n. 6, p. 2039-2089, 2013.
- MORENO-FERNÁNDEZ, J.; DÍAZ-CASTRO, J.; ALFÉREZ, M. J. *et al.* Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J. Dairy Res.*, v. 83, n. 1, p. 81-88, 2016.
- MOUSA, M. M.; ABBAS, A.; AHMED, W. I. *et al.* Bacteriological Quality of Fresh Sausage Sold in Alexandria Governorate. *Alexandria J. Vet. Sci.*, v. 51, n. 2, 2016.
- NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999.
- NANNO, M.; MATSUMOTO, S.; SHIDA, K. *Lactobacillus casei* strain Shirota: benefits based on a long history of usage. *ECAB Health Impact of Probiotics: Vision & Opportunities-E-Book*, p. 85, 2014.
- NAWAZ, M.; WANG, J.; ZHOU, A. *et al.* Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Curr. Microbiol.*, v. 62, n. 3, p. 1081-1089, 2011.
- NEUMANN, E. *Comportamento “in vitro” de estirpes de Lactobacillus acidophilus sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo*. 1991. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- 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.
- NIKBAKHT, E.; KHALESi, S.; SINGH, I. *et al.* Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Eur. J. Nutr.*, v. 57, n. 1, p. 95-106, 2018.
- NOSOVA, T.; JOUSIMIES-SOMER, H.; JOKELAINEN, K. *et al.* Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol Alcohol.*, v. 35, n. 6, p. 561-568, 2000.
- OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int. J. Med. Microb.*, 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* strains due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 68, n. 1, p. 135-140, 2001.
- OJALA, T.; KANKAINEN, M.; CASTRO, J. *et al.* Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 1070, 2014.

OLIVEIRA, A. B. A. D.; PAULA, C. M. D. D.; CAPALONGA, R. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Rev. HCPA*. Vol. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, M. C. P. P. *Efeito protetor de Lactobacillus plantarum (B7) e L. rhamnosus (D1) isolados de queijo Minas artesanal na infecção experimental por Escherichia coli EHEC e EIEC e desenvolvimento de leite de búfala fermentado funcional*. 2016. 83 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLSEN, K. N.; LARSEN, M. H.; GAHAN, C. G. *et al.* The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology*, v. 151, n. 3, p. 925-933, 2005.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D. *et al.* Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rumin. Res.*, v. 68, n. 1, p. 114-125, 2007.

PACIFICO, L.; OSBORN, J. F.; BONCI, E. *et al.* Probiotics for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J. Gastroenterol.*, v. 20, n. 3, p. 673, 2014.

PAN, Q.; ZENG, X. Q.; PENG, L. Y. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from old jar pickles in Sichuan province. *J. Ningbo Univ.*, v. 2, p. 005, 2017.

PANDURU, M.; PANDURU, N. M.; SĂLĂVĂSTRU, C. M. *et al.* Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 29, n. 2, p. 232-242, 2015.

PARK, Y. W. Nutrient and mineral composition of commercial US goat milk yogurts. *Small Rumin. Res*, v. 13, n. 1, p. 63-70, 1994.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nut. Health*, v. 29, p. 48, 1974.

PATEL, A. R.; SHAH, N. P.; PRAJAPATI, J. B. Antibiotic resistance profile of lactic acid bacteria and their implications in food chain. *World J. Dairy Food Sci.*, v. 7, n. 2, p. 202-211, 2012.

PENNA, A.; RAO-GURRAM, S.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yogurt. *Milchwissenschaft*, p. 48-52, 2007.

PEREIRA, M. A. G. *Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no processo de acidificação e pós-acidificação de iogurte*. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

PICON, A.; GARDE, S.; ÁVILA, M. *et al.* Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *Int. Dairy J.*, v. 58, p. 14-22, 2016.

PILCHOVÁ, T.; PILET, M. F.; CAPPELIER, J. M. *et al.* Protective effect of *Carnobacterium* spp. against *Listeria monocytogenes* during host cell invasion using *in vitro* HT29 model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 6, 2016.

PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S. *et al.* The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *Int. Dairy J.*, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2011.

- POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n. 2, 2011.
- PRESTI, I.; D'ORAZIO, G.; LABRA, M. *et al.* Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their *in vitro* effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 99, n. 13, p. 5613-5626, 2015.
- PRINGSULAKA, O.; THONGNGAM, N.; SUWANNASAI, N. *et al.* Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food control*, v. 23, n. 2, p. 547-551, 2012.
- PUERTOLLANO, E.; PUERTOLLANO, M. A.; CRUZ-CHAMORRO, L. *et al.* Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice. *Br. J. Nutr.*, v. 99, n. 4, p. 819-825, 2008.
- QUEREDA, J. J.; DUSSURGET, O.; NAHORI, M. A. *et al.* Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 113, n. 20, p. 5706-5711, 2016.
- RAMIREZ-CHAVARIN, M. L.; WACHER, C.; ESLAVA-CAMPOS, C. A. *et al.* Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *Int. Food Res. J.*, v. 20, n. 2, 2013.
- RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. *et al.* Co-culturing of probiotics influences the microbial and physico-chemical properties but not sensory quality of fermented dairy drink made from goats' milk. *Small Rumin. Res.*, v. 136, p. 104-108, 2016.
- RANDHAWA, M. A. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad*, v. 21, n. 3, p. 184-5, 2009.
- RAY, B.; SPECK, M. L. Freeze-injury in bacteria. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v. 4, n. 2, p. 161-213, 1973.
- REDDY, B. S. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.*, v. 129, n. 7, p. 1478S-1482S, 1999.
- REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.*, v. 4, n. 3, p. 319-324, 2002.
- 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-láticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1532-1538, 2011.
- RETTGER, L. F.; CHEPLIN, H. A. *Bacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Arch. Intern. Med.*, v. 29, n. 3, p. 357-367, 1922.
- RIPERT, G.; RACEDO, S. M.; ELIE, A. M. *et al.* Secreted compounds of the probiotic bacillus clausii strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 60, n. 6, p. 3445-3454, 2016.

- ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*. New York: Marcel Dekker, v. 161, p. 1, 2007.
- ROŠKAR, I.; ŠVIGELJ, K.; ŠTEMPELJ, M. *et al.* Effects of a probiotic product containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 and *Lactobacillus plantarum* MP2026 in lactose intolerant individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial. *J. Funct. Foods*, v. 35, p. 1-8, 2017.
- RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.*, v. 4, p. 396, 2013.
- RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J. *et al.* Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.*, v. 80, n. 3, p. 715-721, 2008.
- RYSER, E. T. Pathogens in milk: *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia Dairy Sci.*, v. 2, p. 1650-1655, 2011.
- SAEZ-LARA, M. J.; GOMEZ-LLORENTE, C.; PLAZA-DIAZ, J. *et al.* The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed. Res. Int.*, v. 2015, 2015.
- SALVA, S.; NUÑEZ, M.; VILLENA, J. *et al.* Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: *in vivo* study of health benefits. *J. Sci. Food Agric.*, v. 91, n. 13, p. 2355-2362, 2011.
- SALVETTI, E.; FONDI, M.; FANI, R. *et al.* Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 36, n. 5, p. 291-305, 2013.
- SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. *Food Control*, v. 42, p. 1-8, 2014.
- SANT'ANNA, F. M.; ACURCIO, L. B.; ALVIM, L. B. *et al.* Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 70, n. 4, p. 592-601, 2017.
- SANTOS, K. M.; OLIVEIRA, I. C.; LOPES, M. A. *et al.* Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. *J. Sci. Food Agric.*, v. 97, n. 4, p. 1108-1115, 2017.
- SANTOS, L. M.; SANTOS, M. M.; DE SOUZA SILVA, H. P. *et al.* Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 200, n. 1, p. 29-38, 2011.
- SAÑUDO, A. I.; LUQUE, R.; DÍAZ-ROPERO, M. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-microbial activity evaluation of inactivated cells of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 against *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v. 84, p. 58-63, 2017.

- 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, n. 1, p. 157, 2011.
- SAVINO, F.; FORNASERO, S.; CERATTO, S. *et al.* Probiotics and gut health in infants: A preliminary case-control observational study about early treatment with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Clin. Chim. Acta*, v. 451, p. 82-87, 2015.
- SEDEWITZ, B.; SCHLEIFER, K. H.; GÖTZ, F. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, v. 160, n. 1, p. 462-465, 1984.
- SENGUPTA, C.; EKKA, M.; DHAWARE, P. D. *et al.* Cross feeding of glucose metabolism byproducts of *Escherichia coli* human gut isolates and probiotic strains affect survival of *Vibrio cholerae*. *Gut pathog.*, v. 9, n. 1, p. 3, 2017.
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 28, n. 4, p. 405-440, 2004.
- SHAH, A.; DARZI, M. M.; KAMIL, S. A. *et al.* Somatic Cell Alteration in Healthy and Mastitic Milk of Sheep and Goats. *J. Entomol. Zool. Stud.*, v. 5, n. 6, p. 27-33, 2017.
- SHARIFI, M.; MORIDNIA, A.; MORTAZAVI, D. *et al.* Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Med. Oncol.*, v. 34, n. 11, p. 183, 2017.
- SHARMA, P.; TOMAR, S. K.; SANGWAN, V. *et al.* Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. *J. Food Saf.*, v. 36, n. 1, p. 38-51, 2016.
- SHU, G.; HE, Y.; WAN, H. *et al.* Effects of Prebiotics on Antioxidant Activity of Goat Milk Fermented by *Lactobacillus plantarum* L60. *Acta Univ. Cibiniensis. Ser. E: Food Technol.*, v. 21, n. 2, p. 11-18, 2017.
- SHU, G.; LEI, N.; WAN, H. *et al.* Effect of temperature and inoculum size on goat yogurt fermented by *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus casei*. *Carpathian J. Food Sci. Technol.*, v. 7, n. 4, 2015.
- SILVA, B. C.; JUNG, L. C. R.; SANDES, S. H. C. *et al.* *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef. Microb.*, v.4, p.267-275, 2013.
- SILVA, F. A.; OLIVEIRA, M. E. G.; DE FIGUEIRÊDO, R. M. F. *et al.* The effect of Isabel grape addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. *Food Funct.*, v. 8, n. 6, p. 2121-2132, 2017.
- SILVA, J. G. *Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais*. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.*, v. 6 p. 791, 2015.
- SIP, A.; WIĘCKOWICZ, M.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. *et al.* Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, v. 26, n. 1, p. 117-124, 2012.

- SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I. *et al.* Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiol.*, v. 47, p. 74-84, 2015.
- SLAČANAC, V.; BOŽANIĆ, R.; HARDI, J. *et al.* Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 63, n. 2, p. 171-189, 2010.
- SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G. *et al.* Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiol.*, v. 38, p. 240-249, 2014.
- SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, v. 11, n. 4, p. 327-345, 2001.
- SRIVIDYA, D.; SV, C. P.; DHARMESH, S. M. *et al.* Anti-*Shigella dysenteriae* activity by probiotic lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus*); an *in vitro* study. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, v. 4, n. 4, p. 317, 2015.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.*, v. 36, p. 1-29, 1997.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). *Food microbiology, fundamentals and frontiers*. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, n.18, p.383-409, 2001.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- TACHEDJIAN, G.; ALDUNATE, M.; BRADSHAW, C. S. *et al.* The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res. Microbiol.*, 2017.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TAMIME, A. Y.; SAARELA, M. A. K. S.; SONDERGAARD, A. K. *et al.* Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic dairy products*, p. 39-72, 2005.
- TASKILA, S.; OJAMO, H. The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*. InTech, 2013.
- THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, n. 1, p. 7-17, 2006.
- TILLISCH, K.; LABUS, J.; KILPATRICK, L. *et al.* Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterol.*, v. 144, n. 7, p. 1394-1401. e. 4, 2013.
- TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rDNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, v.35, p.49-56, 1997.

- TISSIER, H. Treatment of intestinal infections using bacterial flora of the intestine. *Crit. Ver. Soc. Biol.*, v. 60, p. 359-61, 1906.
- TRIVEDI, J. B.; PRAJAPATI, J. B.; NAIR, B. M. *et al.* Fermentation kinetics and sensory attributes of milk fermented by probiotic bacteria. *Int. J. Fermented Foods*, v. 3, n. 1, p. 75, 2014.
- TYNKKYNEN, S.; SINGH, K. V.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 41, n. 3, p. 195-204, 1998.
- VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 excludes *Listeria monocytogenes* from the GIT, as shown by bioluminescent studies in mice. *Benef. Microbes*, v. 7, n. 2, p. 227-235, 2016.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.
- VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C. *et al.* Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2010.
- VUKOTIĆ, G.; STRAHINIĆ, I.; BEGOVIĆ, J. *et al.* Survey on proteolytic activity and diversity of proteinase genes in mesophilic lactobacilli. *Microbiol.*, v. 85, n. 1, p. 33-41, 2016.
- WAGNER, M.; ELISKASES-LECHNER, F.; RIECK, P. *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. *J. Food Prot.*, v. 69, n. 6, p. 1297-1303, 2006.
- WALKER, D. K.; GILLILAND, S. E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*1. *J. Dairy Sci.*, v. 76, n. 4, p. 956-961, 1993.
- WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J. AOAC Int.*, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.
- WONG, A.; SAINT NGU, D. Y.; DAN, L. A. *et al.* Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. *Nutr. J.*, v. 14, n. 1, p. 95, 2015.
- YADAV, A. K.; SINGH, J.; YADAV, S. K. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian J. Dairy Food Res.*, v. 35, n. 2, 2016.
- YANAGIDA, F.; CHEN, Y. S.; YASAKI, M. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *J. Basic Microbiol.*, v. 47, n. 2, p. 184-190, 2007.
- ZALÁN, Z.; HUDÁČEK, J.; ŠTĚTINA, J. *et al.* Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 230, n. 3, p. 395, 2010.

8. ANEXOS

ANEXO I: 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 II: Ficha de avaliação sensorial dos leites fermentados entregue aos avaliadores.

Avaliação Sensorial de Leites Fermentados por Lactobacilos Isolados de Queijos Minas Artesanais

Você está recebendo **quatro** amostras de **leite fermentado** codificadas, avalie-as, de preferência, **em ordem crescente** segundo a **escala hedônica** abaixo quanto à **aceitação** do produto.

Avalie também, por gentileza, a **intenção de compra** de **cada** um dos leites fermentados provados com um **sim** ou **não** no espaço designado.

Caso tenha alguma **observação**, use o espaço designado.

Escala Hedônica de Pontos

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

Quadro de Avaliação

Amostra	Aceitação (1 a 5)	Intenção de compra (sim ou não)	Observações

Obrigado pela sua colaboração e participação!

ANEXO III: 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.

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

