



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



**ESTUDO PREDITIVO DA VIABILIDADE E DA AÇÃO ANTAGONISTA DE
Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 EM IOGURTE INTEGRAL DE LEITE DE
CABRA**

MARCOS UBIRATAM FILGUEIRA OLIVEIRA MENEZES

Recife

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARCOS UBIRATAM FILGUEIRA OLIVEIRA MENEZES

**ESTUDO PREDITIVO DA VIABILIDADE E DA AÇÃO ANTAGONISTA DE
Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 EM IOGURTE INTEGRAL DE LEITE DE
CABRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade
CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Neila Mello dos Santos Cortez

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M543e Menezes, Marcos Ubiratam Filgueira Oliveira
Estudo preditivo da viabilidade e da ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 em iogurte integral de leite de cabra / Marcos Ubiratam Filgueira Oliveira Menezes. - 2020.
102 f. : il.
- Orientadora: Samara Alvachian Cardoso .
Coorientadora: Neila Mello dos Santos Cortez.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2020.
1. probiótico. 2. modelagem matemática. 3. viabilidade microbiana. I. , Samara Alvachian Cardoso, orient. II. Cortez, Neila Mello dos Santos, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**ESTUDO PREDITIVO DA VIABILIDADE E DA AÇÃO ANTAGONISTA DE
Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 EM IOGURTE INTEGRAL DE LEITE DE
CABRA**

Por Marcos Ubiratam Filgueira Oliveira Menezes

Esta dissertação foi julgada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 17/02/2020 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa Dra. Celiane Gomes Maia da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa Dra. Erilane de Castro Lima Machado
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa Dra. Silvana Magalhães Salgado
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação aos meus pais
Neide e Marcos que estão sempre ao
meu lado.

AGRADECIMENTOS

A princípio gostaria de agradecer a Deus por me proporcionar tamanha oportunidade e guiar minha trajetória;

Aos meus pais, familiares e amigos por todo incentivo e paciência ao longo dessa jornada;

À prezada professora Samara Alvachian pelo valioso suporte e orientação nesta pesquisa;

À querida professora e amiga Neila Cortez pela co-orientação neste projeto e, sobretudo, por todo ensinamento, incentivo, disponibilidade e confiança, sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui.

Às professoras Celiane Gomes, Erilane Machado e Silvana Salgado por aceitarem compor a banca de defesa e contribuir com este trabalho;

À toda equipe técnica, alunos e bolsistas do Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia Química da UFPE pela companhia e auxílio durante os experimentos, em especial a Graciliane Ximenes, Estephane Pereira, Márcia Santos e Rikelyne Gonçalves.

Ao químico industrial Ítalo Nascimento e ao graduando Gabriel Cicalese pela gentileza de compartilharem o conhecimento da modelagem preditiva;

Aos professores do PGCTA do Departamento de Ciências Doméstica da UFRPE pelos valiosos ensinamentos acerca da Ciência e Tecnologia de Alimentos;

Aos meus colegas e amigos do trabalho pela compreensão e fundamentais permutas de horários, sem as quais eu não conseguiria concluir o mestrado;

Aos meus amigos da turma “Sucupira”, em especial Amanda, Indira, Thaynná e Eduardo, por todos os momentos de descontração, estudos e apoio em todas as etapas do curso. Muito obrigado!

“Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar”

Antonio Machado

RESUMO

A incorporação de probióticos aos leites fermentados, além de proporcionar benefícios à saúde do consumidor, pode contribuir para a inibição de culturas patogênicas presentes nos alimentos. Esta pesquisa teve como objetivos fazer um estudo preditivo do comportamento da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 durante as etapas de fermentação e estocagem de iogurte integral de leite de cabra, e avaliar diferentes modelos matemáticos quanto a predição da ação antagonista deste probiótico diante das cepas *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Salmonella typhimurium* (CCCD-S004) e *Escherichia coli* (CCCD-E009), inoculados em iogurte caprino. Para o estudo da viabilidade probiótica, fez-se contagem seletiva de *L. acidophilus* em meio MRS adicionado do antibiótico clindamicina, e os dados foram ajustados para o modelo de Baranyi e Roberts, com auxílio do software DMFit 3.5. A modelagem apresentou bom ajuste aos dados observados, com coeficiente de regressão $> 0,97$ e erro quadrático médio (RMSE) próximo de zero. As amostras de iogurte com e sem probiótico foram contaminadas com patógenos a partir de suspensões com concentração equivalente a escala 1,0 do padrão McFarland, separadamente, e armazenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 42 dias. Realizou-se a contagem das diferentes bactérias a cada 24h e os dados foram ajustados aos modelos de Baranyi e Roberts, Weibull e Bifásico, através dos softwares DMfit 3.5 e GInaFit 1.7. A avaliação estatística foi realizada por meio dos parâmetros estatísticos R^2 , RMSE, fator bias e fator exatidão e análise de variância (ANOVA), com uso do Statistic for Windows 7.0. Observou-se uma maior redução de patógenos nas amostras com adição do probiótico, atestando sua propriedade antimicrobiana. O modelo de Baranyi e Roberts foi o mais adequado para descrever a inibição das cepas de *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*, com RMSE de 0,16, 0,14 e 0,19, respectivamente. O modelo Bifásico explicou melhor o comportamento da estirpe de *S. aureus*, com RMSE de 0,18 e R^2 igual a 0,98. A adição de *L. acidophilus* mostrou ser uma alternativa eficaz para a produção de iogurte de leite caprino mais seguro e a modelagem pode ser uma aliada da indústria de laticínios quanto a otimização de processos e gerenciamento de riscos.

Palavras-chave: probiótico, modelagem matemática, viabilidade microbiana

ABSTRACT

The incorporation of probiotics in fermented milk, in addition to the consumer health benefits, can contribute to the inhibition of pathogenic cultures present in food. This research aimed to make a predictive study of the probative behavior of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, during the fermentation and storage stages of goat yogurt, and the mathematical methods on the prediction of antagonistic action of this type of *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Salmonella typhimurium* (CCCD-S004) and *Escherichia coli* (CCCD-E009), inoculated in goat yogurt. For the study of probiotic viability, the selective counting of *L. acidophilus* in the MRS medium was added to the antibiotic clindamycin, and the data were adjusted for the Banaryi and Roberts model, with the aid of the DMFit 3.5 software. A model displayed with good fit to the observed data, with regression coefficient > 0.97 and mean square error (RMSE) close to zero. As yogurt samples and without probiotics, they were contaminated with suspension pathogens with a concentration equivalent to a scale of 1.0 in McFarland, allowed and stored at 4 ± 1 °C for 42 days. A count of the different bacteria was performed every 24 hours and the data were adjusted to the models of Baraniy and Roberts, Weibull and Bifhasic, using the software DMfit 3.5 and GInaFit 1.7. The statistical evaluation was performed using the statistical parameters R2, RMSE, polarization factor and precision of analysis and variance (ANOVA), using Statistic for Windows 7.0. Observe a greater reduction of pathogens in the quantities with the addition of probiotic, attesting to its antimicrobial property. The Barany and Roberts model was the most adequate to describe the inhibition of the *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* and *E. coli* strains, with RMSE of 0.16, 0.14 and 0.19, respectively. The biphasic model better explained the behavior of the type *S. aureus*, with RMSE of 0.18 and R2 equal to 0.98. The addition of *L. acidophilus* has proven to be an effective alternative for making goat's milk yogurt more safely and modeling can be an ally of the dairy industry in terms of process optimization and risk management.

Key-words: probiotic, mathematical modeling, microbial viability

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA
ANVISA - AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
BAL – BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS
CCCD - COLEÇÃO DE CULTURAS DA CEFAR DIAGNÓSTICA
CN - CALDO NUTRIENTE
DEQ - DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
DTA – DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS
DVS - DIRECT VAT SET
EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
EST - EXTRATO SECO TOTAL
FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA
ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
MSE – ERRO MÉDIO QUADRÁTICO
MRS – MAN ROGOSA & SHARPE
MRS-CL – MAN ROGOSA & SHARPE COM CLORIDRATO DE CLINDAMICINA
PH - POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
PMP - PATHOGEN MODELING PROGRAM
POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL
RMSE - RAIZ DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO
SSP - SOLUÇÃO SALINA PEPTONADA
SUH - SÍNDROME URÊMICA HEMOLÍTICA
UFC – UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS
UFPE – UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UFRPE – UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
USDA - DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS
VRBG - ÁGAR VERMELHO VIOLETA BILE GLICOSE

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 - Composição do leite de cabra, vaca e ovelha	19
Quadro 2 - Principais bactérias probióticas utilizadas em alimentos	22
Quadro 3 - Exemplos de bacteriocinas produzidas por cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	25
Quadro 4 - Microrganismos envolvidos com doenças transmitidas por alimentos	27
Quadro 5 - Principais modelos matemáticos primários de crescimento microbológico..	33
Quadro 6 - Principais programas computacionais associados à microbiologia preditiva.	35

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de iogurte integral de leite caprino adicionado de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI L10 comparados com a legislação vigente	58
Tabela 2 - Concentrações de bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i> em iogurte integral de leite de cabra obtidas em meio MRS sem adição de antibiótico (MRS) e com adição de cloridrato de clindamicina (MRS-CL).....	59
Tabela 3 - Concentração de <i>L. acidophilus</i> LAFTI L10, pH e acidez durante a fermentação do iogurte integral de leite de cabra entre 0 e 6,5 horas a 42 ± 1 °C	60
Tabela 4 - Dados de parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos para o modelo de Baranyi e Roberts na etapa de fermentação do iogurte de leite de cabra	62
Tabela 5 - Concentração de <i>L. acidophilus</i> , pH e acidez durante o armazenamento do iogurte integral de leite de cabra durante 35 dias a 4 ± 1 °C	62
Tabela 6 - Dados de parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos para o modelo de Baranyi e Roberts	64

ARTIGO 2

Tabela 1 - Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sem adição de <i>L. acidophilus</i> (I0) e com adição de <i>L. acidophilus</i> (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C	80
Tabela 2 - Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com <i>Staphylococcus aureus</i> sem adição de <i>L. acidophilus</i> (I0) e com adição de <i>L. acidophilus</i> (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	80
Tabela 3 - Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com <i>Salmonella typhimurium</i> sem adição de <i>L. acidophilus</i> (I0) e com adição de <i>L. acidophilus</i> (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C	81
Tabela 4 - Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com <i>Escherichia coli</i> sem adição de <i>L. acidophilus</i> (I0) e com adição de <i>L. acidophilus</i> (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	80
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos obtidos da modelagem de inativação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Escherichia coli</i> em iogurte de leite de cabra integral para os modelos de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull	89
Tabela 6 - Índices estatísticos obtidos da modelagem de inativação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCCD-P004, <i>Staphylococcus aureus</i> CCCD-S009, <i>Salmonella typhimurium</i> CCCD-S004 e <i>Escherichia coli</i> CCCD-E009 em iogurte de leite de cabra integral para os modelos de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull	90

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Dados de surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2007 e 2017 26
- Figura 2** – Curva de crescimento bacteriano típica 30

ARTIGO 1

- Figura 1** – Culturas de *L. acidophilus* LAFTI L10 ativadas em leite desnatado reconstituído 52
- Figura 2** – Esquema simplificado da produção de iogurte integral de leite de cabra 53
- Figura 3** – Colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI-L10 em meio MRS adicionado de clindamicina (MRS-CL): visão geral (A) e visão aproximada da placa (B).57
- Figura 4** - Valores de contagem de *L. acidophilus* por plaqueamento em meio MRS-CL e valores preditos pela curva do modelo Baranyi e Roberts na etapa de fermentação do iogurte de leite de cabra a 43 ± 1 °C 61
- Figura 5** - Valores da contagem de *L. acidophilus* por plaqueamento em meio MRS-CL e os valores preditos pela curva do modelo Baranyi e Roberts durante estocagem do iogurte de leite de cabra a 4 ± 1 °C 64

ARTIGO 2

- Figura 1** – Cepas patogênicas liofilizadas da Coleção de Culturas da Cefar Diagnóstica. 74
- Figura 2** – Colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* em placas de Agar Cetrimide (a), colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em placas de Agar Baird Parker (b), colônias típicas de *Salmonella typhimurium* em placas de Ágar Ágar Verde Brilhante (c) e colônias típicas de *Escherichia coli* em placas de Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (d)..... 77
- Figura 3** – Contagem de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 em iogurte de leite de cabra contaminado com *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Staphylococcus aureus* (b), com *Salmonella typhimurium* (c) e com *Escherichia coli* (d) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C 81
- Figura 4** - Comparativo da viabilidade de *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Salmonella typhimurium* (c) e *Escherichia coli* (d) em iogurte integral de leite de cabra sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante armazenamento a 4 ± 1 °C 83
- Figura 5** - Comparação da inibição observada e prevista de *Pseudomonas aeruginosa* para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a 4 ± 1 °C 86

Figura 6 - Comparação da inibição observada e prevista de <i>Staphylococcus aureus</i> para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	87
Figura 7 - Comparação da inibição observada e prevista de <i>Salmonella typhimurium</i> para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	87
Figura 8 - Comparação da inibição observada e prevista de <i>Escherichia coli</i> para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Leite de cabra e derivados	19
3.2 Alimentos funcionais e os probióticos.....	20
3.2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
3.3 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).....	25
3.4 Microbiologia de alimentos	29
3.4.1 Microbiologia preditiva	31
3.4.1.1 Modelos matemáticos	32
3.4.1.2 Programas computacionais associados a microbiologia preditiva	34
3.4.1.3 Validação estatística	36
REFERÊNCIAS	37
4. RESULTADOS	48
ARTIGO 1: ESTUDO DA VIABILIDADE DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> EM IOGURTE INTEGRAL DE LEITE DE CABRA	48
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.2.1 Materiais	51
4.2.2 Preparo da cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI L10.....	51
4.2.3 Produção do iogurte integral de leite de cabra	52
4.2.4 Ensaio físico-químico	53
4.2.4.1 pH	54
4.2.4.2 Acidez.....	54
4.2.4.3 Lipídios: método de Gerber	54
4.2.4.4 Proteínas (nitrogênio total)	54
4.2.4.5 Extrato seco total e Umidade	54
4.2.4.6 Cinzas	54
4.2.5 Ensaio microbiológico	55
4.2.5.1 Preparo de meios de cultura e solução de cloridrato de clindamicina	55
4.2.5.2 Avaliação do uso de cloridrato de clindamicina para contagem seletiva de <i>L.</i>	

<i>acidophilus</i> LAFTI L10.....	55
4.2.5.3 Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFT-L10.....	56
4.2.6 Modelagem matemática dos dados	57
4.2.7 Análise estatística	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.3.1 Caracterização físico-química da amostra	58
4.3.2 Avaliação do uso de cloridrato de clindamicina para contagem seletiva de <i>L.</i>	
<i>acidophilus</i> LAFTI L10.....	58
4.3.3 Cinética de fermentação	59
4.3.4 Modelagem de crescimento de <i>L. acidophilus</i> LAFTI L10 na etapa de fermentação	
.....	61
4.3.5 Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI L10 durante o tempo de	
armazenamento a 4 °C	62
4.3.6 Modelagem da viabilidade de <i>L. acidophilus</i> na etapa de armazenamento	64
4.4 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	66
ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS NA PREDIÇÃO DA	
AÇÃO ANTAGONISTA DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> FRENTE À ESTIRPES	
PATOGÊNICAS EM IOGURTE DE LEITE DE CABRA	70
4.5 INTRODUÇÃO	72
4.6 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.6.1 Preparação das amostras de iogurte	73
4.6.2 Preparo do kit de McFarland	74
4.6.3 Cepas patogênicas	74
4.6.3.1 Ativação das cepas patogênicas	74
4.6.3.2 Inoculação das culturas patogênicas	75
4.6.4 Contagem de patógenos nas amostras contaminadas	75
4.6.4.1 Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCCD-P004	75
4.6.4.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> CCCD-S009.....	76
4.6.4.3 Contagem de <i>Salmonella typhimurium</i> CCCD-S004	76
4.6.4.4 Contagem de <i>Escherichia coli</i> CCCD-E009	76
4.6.5 Testes bioquímicos	77
4.6.6 Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI L-10	78
4.6.7 Ensaios físico-químicos	78

4.6.8 Modelagem matemática dos dados	78
4.6.9 Análise estatística	79
4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.7.1 Caracterização das cepas patogênicas e das amostras contaminadas	79
4.7.2 Avaliação da ação antagonista de <i>L. acidophilus</i> frente as estirpes patogênicas ..	82
4.7.3 Modelagem matemática	86
4.8 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
APÊNDICES	98
ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

Tem sido cada vez mais crescente a procura por leite de cabra e seus derivados lácteos, principalmente devido ao seu elevado valor nutricional. É um alimento rico em proteínas, vitaminas e minerais, contendo ácidos graxos de cadeia curta e menores tamanhos dos glóbulos de gordura, fazendo com que a digestão e absorção do leite sejam rápidas, além de possuir menor carga alergênica (CLARK; MORA, 2017; VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o leite caprino é a terceira maior variedade de leite produzida no mundo, correspondendo a 13,5% da produção mundial de leite e a 2% da produção da indústria de laticínio no mundo (FAOSTAT, 2018; RANADHEERA et al., 2019).

Com produção de mais de 15 milhões de toneladas em 2016, tendências de mercado sugerem que a produção de leite de cabra crescerá mais de 50% até 2030 (FAOSTAT, 2018; PULINA et al., 2018). O leite caprino pode ser utilizado como matéria-prima para produção de diversos produtos lácteos, a exemplo de iogurtes, além de ser uma boa matriz alimentar para a incorporação de componentes funcionais, como microrganismos probióticos. Esta combinação, inclusive, tem sido objeto de diversas pesquisas acadêmicas e nas indústrias de laticínios (FAZILAH et al., 2018; MACHADO et al., 2017; VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

Os principais probióticos utilizados no processamento de derivados lácteos são dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018). A espécie *Lactobacillus acidophilus* é uma das mais utilizadas em alimentos e destaca-se por sobreviver a meios mais ácidos que outros microrganismos probióticos, além de ter a propriedade de produção de metabólitos antimicrobianos, grande aliado ao tratamento e prevenção de infecção por patógenos, importantes agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos (DUARTE et al., 2016; SILVA et al., 2017; SHOKRYAZDAN et al., 2014).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, demonstram que entre os anos de 2007 e 2017 foram notificados 12.503 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, com 236.403 pessoas doentes e uma taxa de mortalidade de 0,08%, sendo a região Nordeste a segunda maior em número de surtos de DTA notificados. Patógenos presentes em leite e derivados foram responsáveis por 3,24% desses surtos no país (BRASIL, 2018).

A transmissão da doença pode ocorrer quando se ingere um alimento contaminado por microrganismos, como bactérias, parasitas e vírus, produtos químicos e toxinas, já a gravidade da enfermidade varia de acordo com a idade e estado do sistema imunológico do indivíduo, dentre outros fatores (FDA, 2019; MA et al., 2018). Dentre os mais conhecidos agentes etiológicos de importância em alimentos, destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*. Só no Brasil, os três primeiros corresponderam a mais de 80% dos surtos de DTA identificados até 2017 (BRASIL, 2018).

Conhecer o comportamento dos microrganismos presentes nos alimentos, em determinadas condições ambientais, é importante para atestar a qualidade microbiológica desses produtos e avaliar riscos de contaminação (ARROYO-LÓPEZ et al., 2014). A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia de alimentos que objetiva prever o comportamento microbiano (multiplicação, inativação e interações) nos alimentos através de modelos e equações matemáticas (ALVARENGA et al., 2018; LONGHI et al., 2013). Com isso, pode-se determinar o tempo de validade de alimentos, assim como conhecer as melhores condições de processamento, de otimização e de armazenamento (TELEKEN et al., 2011).

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um iogurte de leite de cabra integral adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e fazer um estudo preditivo da viabilidade deste probiótico e da sua ação antagonista frente a estirpes de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, durante o período de armazenamento do produto sob refrigeração.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Produzidos principalmente por pequenos produtores rurais, diversos autores relatam a baixa qualidade microbiológica dos produtos derivados de leite caprino, como a presença de agentes patogênicos, a exemplo da *Escherichia coli*. Apesar do conhecimento dos benefícios do uso de probióticos em alimentos, ainda não há muitos estudos da ação antimicrobiana que estes promovem em patógenos presentes em iogurte de leite de cabra. Assim, o uso de *Lactobacillus acidophilus* no referido produto pode ser uma alternativa para contribuir para a inocuidade do mesmo, beneficiando, principalmente, os pequenos produtores da região semiárida nordestina brasileira.

Hipótese: A cultura do probiótico *Lactobacillus acidophilus* será capaz de crescer e inibir culturas patogênicas inoculadas em iogurte de leite de cabra durante o armazenamento sob refrigeração e será possível apontar modelos matemáticos que melhor representem a variação de concentração desses patógenos ao longo do tempo, assim como o comportamento do probiótico nas etapas de fermentação e armazenamento da matriz láctea.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite de cabra e derivados

O leite de cabra é um alimento completo e saudável, sendo considerado, nutricionalmente, o mais semelhante ao leite humano (CLARK; MORA, 2017; JIA et al., 2015). Em comparação ao leite bovino, apresenta elevado valor biológico e diferentes qualidades nutricionais, conforme apresentado no Quadro 1. É rico em proteínas, vitaminas e minerais, contendo ácidos graxos de cadeia curta e menores tamanhos dos glóbulos de gordura, fazendo com que a digestão e absorção do leite sejam rápidas, além de possuir menor carga alergênica. Essas características fazem com que o leite de cabra seja um alimento altamente recomendado para crianças e adultos sensíveis ou alérgicos ao leite de vaca (CIVIDINI et al., 2011; THUM et al., 2015; GETANEH et al., 2016; VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

Quadro 1 - Composição do leite de cabra, vaca e ovelha

Composição	Cabra (%)	Vaca (%)	Ovelha (%)
Sólidos totais	13.9	13.5	19.3
Gordura	4.8	4.8	7.6
Proteína	3.7	2.8	5.5
Lactose	5.0	4.5	-
Cinzas (minerais)	0.85	0.74	-

Fonte: GETANEH et al. (2016).

A produção de leite caprino no mundo teve uma elevação de 44,10% em 2014, comparada com o ano de 2000, totalizando 18.340.016 toneladas (MARTÍN et al., 2017; BELTRÁN et al., 2015). No Brasil, a cadeia produtora do leite de cabra é um dos setores com grande potencial de crescimento. Segundo o último censo agropecuário, a produção de leite de cabra do país foi de 25.353.000 litros em 2017, além de apontar um aumento de 16,11% do rebanho de caprinos no Brasil, totalizando 8.252.706 cabeças (IBGE, 2017). A região Nordeste concentra aproximadamente 90% do rebanho caprino nacional, entretanto possui cadeias de produção com baixa produtividade, decorrente principalmente da carência de investimento tecnológico e sistemas eficientes de gestão (EMBRAPA, 2018).

Destinados principalmente ao consumo de subsistência familiar e ao pequeno comércio, estima-se que o consumo *per capita* de leite caprino e seus derivados no Brasil seja de apenas 1,2 kg/ano (EMBRAPA, 2018). Apesar da qualidade nutricional, o leite de cabra ainda encontra barreiras no quesito de aceitação por parte dos consumidores,

principalmente devido as suas características sensoriais. O odor e o sabor característicos do leite caprino podem ser atribuídos ao elevado conteúdo de ácidos graxos de cadeias médias, tais como os ácidos capróico, caprílico e cáprico (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018)

É crescente o desenvolvimento de produtos lácteos derivados do leite de cabra, a exemplo de iogurtes, bebidas lácteas e queijos, como forma de minimizar e mascarar o *flavour* característico do leite de cabra e tornar os produtos mais atrativos ao paladar do consumidor (MACHADO et al, 2017; EMBRAPA, 2018). Uma maior demanda por alimentos hipoalergênicos e funcionais também está contribuindo para o aumento de produção de derivados de leite caprino, principalmente do iogurte (FAZILAH et al, 2018; RANADHEERA, NAUMOVSKI, AJLOUNI, 2018).

O iogurte é definido pela legislação brasileira como um leite fermentado, obtido por coagulação e diminuição do pH, provocado por fermentação láctica. Além disso, deve apresentar consistência pastosa, possuir acidez de 0,6 a 1,5% (ácido láctico) e estar isento de impurezas, microrganismos patogênicos e coliformes (BRASIL, 2007).

Considerado o leite fermentado mais popular do mundo, o iogurte é uma importante fonte de nutrientes, principalmente de proteínas e cálcio. Este derivado também contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal, uma vez que pode transportar microrganismos vivos com efeitos benéficos à saúde (MORELLI, 2014; SIVIERI, et al., 2017). Além disso, é considerado uma excelente matriz para incorporação de novos ingredientes, tais como frutas, geleias, mel e componentes funcionais (SILVA et al., 2017a; VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

No Brasil, o iogurte de leite caprino é produzido em maior escala na região Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009). A qualidade do produto final é diretamente influenciada pelas características do leite utilizado como matéria-prima, que variam devido a fatores como a raça, fase de lactação, ambiente e nutrição dos animais (GURSEL *et al.*, 2016).

3.2 Alimentos funcionais e os probióticos

Devido a uma maior conscientização da população, é cada vez mais crescente a busca por alimentos saudáveis e funcionais. Entende-se por alimentos funcionais aqueles alimentos que proporcionam algum tipo de benefício adicional à saúde do consumidor. São semelhantes aos alimentos convencionais, porém adicionados, ou abundantes, de componentes que promovam melhorias na saúde e longevidade, a exemplo de soja e suco

de laranja enriquecido com cálcio (HELLER, 2009; WONG et al., 2015).

A maior procura por alimentos funcionais levou ao aumento de pesquisas na área, tanto na academia quanto na indústria, com o objetivo de desenvolver uma variedade de produtos com apelo funcional para atendimento do mercado (FAZILAH, et al., 2018; MELLENTIN; HEASMAN, 2014; WONG; LAI; CHAN, 2015).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais, o faturamento com alimentos funcionais no Brasil é em média 10 bilhões de dólares por ano (ABIAD, 2016). Os produtos da indústria de laticínios são os líderes do mercado de alimentos funcionais, principalmente devido à adição de microrganismos probióticos e de prebióticos aos derivados lácteos, como queijos e iogurtes (KUMAR et al., 2015; WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Probióticos são microrganismos vivos cuja função, quando presentes em quantidade adequada, é produzir efeitos benéficos à saúde de quem os consomem, através de melhoria do equilíbrio da microbiota intestinal (HILL et al., 2014). Devido aos seus benefícios, o uso de probióticos em alimentos é objeto de muitas pesquisas científicas, que cresceram exponencialmente nas duas últimas décadas. Uma maior conscientização dos consumidores, em busca de dietas mais saudáveis, está impulsionando a procura por estes alimentos e bebidas funcionais (NIKMARAM, et al., 2016; SHOKRYAZDAN et al., 2014; PANDEY et al., 2015).

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que a utilização de probióticos em alimentos seja realizada apenas após a comprovação da segurança e efeitos benéficos do microrganismo, que deve sobreviver ao trato digestório humano, além da evidência de estudos que identifiquem a espécie e caracterizem sua linhagem (BRASIL, 2018).

Os principais alimentos utilizados para incorporação de probióticos são os produtos lácteos, especialmente os iogurtes, bebidas lácteas e leites fermentados, embora outras matrizes alimentares também sejam utilizadas, como queijos, sucos de frutas e cereais (Figura 1) (KERRY et al., 2018; PEREIRA et al, 2018). O leite e seus derivados são um excelente meio de transporte e reprodução de probióticos e, embora já estejam no mercado há mais de uma década, há estudos e promessa de lançamentos de novos produtos envolvendo esses microrganismos (KHAN, 2014).

Os probióticos mais comuns incorporados aos produtos lácteos são as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (PEREIRA et al, 2018), cujas principais espécies estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Principais bactérias probióticas utilizadas em alimentos

Gênero	Espécie
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. amylovarus</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. john-sonii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. sali-varius subsp. salivarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> , <i>L. paracasei subsp. tolerans</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i>

Fonte: PEREIRA et al. (2018); KANDYLIS (2016).

Além dessas bactérias, existem outros microrganismos que apresentam ação probiótica, como por exemplos: *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces boulardii* e *Leuconostoc* (YERLIKAYA, 2014).

Embora não haja um entendimento único, estima-se que o número mínimo de microrganismos probióticos em alimentos, para que ocorra os benefícios esperados, seja de no mínimo 10^6 unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro do produto (UFC/g ou UFC/mL), até o prazo final de validade (PARKER et al., 2018; SANGAMI; SRI, 2017).

As cepas probióticas possuem propriedades específicas, tecnológicas e funcionais, que as diferenciam das demais culturas microbianas. Além de serem resistentes ao processamento do alimento e condições de armazenamento, incluindo baixas temperaturas, até o momento do consumo, esses organismos devem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal até chegar e colonizar-se no intestino delgado (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018; KANDYLIS et al, 2016).

Bactérias probióticas podem produzir uma série de produtos metabólicos que não devem ser de origem patogênica, pelo contrário, é desejável que esses componentes possuam ação antagonista diante de microrganismos patogênicos, protegendo o hospedeiro consumidor (RANADHEERA et al, 2017; SANGAMI; SRI, 2017).

Em relação aos benefícios à saúde, são vários os estudos que comprovam essa propriedade dos probióticos. Há evidências que esses microrganismos atuam, entre outras, no combate a infecções, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; ZOUMPOPOULOU; TSAKALIDOU; PAPANIMITRIOU, 2016). Como exemplo, um estudo realizado por Tonucci et al. (2016), com pacientes diabéticos tipo 2, concluiu que a ingestão diária de leite fermentado

contendo *L. acidophilus* La5 e *B. lactis*, por 6 semanas, diminuiu significativamente os níveis de glicemia em jejum e colesterol total.

Outras pesquisas atestaram a atividade antagonista de cepas probióticas diante de organismos patogênicos, cuja ação ocorre devido a formação de agentes metabólicos, principalmente de bacteriocinas, que são proteínas e peptídeos com ação antimicrobiana. Outras substâncias antagônicas também são produzidas, como alguns tipos de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e radicais livres (CRUZ et al., 2009; DUARTE et al., 2016).

Shokryazdan et al. (2014) realizaram um estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de nove cepas de *Lactobacillus* contra algumas cepas patogênicas humanas, dentre elas a *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, concluindo que ambas cepas de *Lactobacillus* mostraram forte atividades inibitórias contra uma ampla gama de microrganismos perigosos à saúde humana. Em outro estudo, Toualbia et al. (2018) concluíram que o probiótico *Lactobacillus plantarum* possui efeitos inibitórios contra alguns microrganismos causadores de diarreia, a exemplo da *Escherichia fergusonii* e *Salmonella enterica subsp. diarizonae*.

Apesar da predominância de derivados lácteos de origem bovina, quanto à adição de bactérias probióticas, o leite de cabra e seus produtos também aparecem como matrizes com grande potencial de desenvolvimento e fornecimento desses microrganismos (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

O uso de probióticos em leite caprino e derivados aumentou rapidamente na última década e tem sido o centro de muitos estudos, que já demonstraram, além dos benefícios à saúde, sua eficiência quanto ao melhoramento das características sensoriais desses produtos (RANADHEERA et al., 2019).

Nos leites fermentados, as culturas iniciadoras e probióticas fornecem enzimas importantes para as reações de quebra de proteínas (proteólise), da lactose (glicólise) e da gordura (lipólise), responsáveis pela transformação do sabor nesses alimentos, através da formação de compostos voláteis e aromáticos (MARCO et al., 2017). Devido à grande biodiversidade natural dos probióticos, a incorporação destes em alimentos derivados de leite de cabra aparece com grande potencial de torna-los mais atraentes para o consumidor (RANADHEERA et al., 2019).

Machado et al. (2017) comprovaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em iogurte de leite de cabra com adição de mel de abelha, com contagem acima de 6 log UFC/g durante 28 dias de validade. Durante um mesmo período, Costa et al. (2015)

constatarem concentração de *L. acidophilus* acima de 7 log UFC/g em iogurte de leite caprino adicionado de polpa de cupuaçu. Meira et al. (2015) avaliaram os efeitos do uso dos probióticos *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus acidophilus* em queijo ricota de cabra e constatarem que o produto é uma excelente matriz para a viabilidade dessas cepas, uma vez que a concentração de cada uma delas foi de aproximadamente 6 log UFC/ g, além de não ter afetado negativamente a qualidade do alimento.

3.2.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus é uma das espécies mais conhecidas do gênero *Lactobacillus*, principalmente devido à sua utilização em vários alimentos fermentados em todo mundo. São bactérias em forma de bastão, bacilos, anaeróbios e homofermentadores, com extremidades arredondadas. Possuem temperatura ótima de crescimento a 45°C e são exigentes quanto à presença de substratos orgânicos, tais como carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas. E, embora possuam melhor crescimento em meios levemente ácidos (pH de 4,5 a 6,4), são capazes de sobreviverem a meios mais ácidos que outros microrganismos probióticos (OZOGUL; HAMED, 2016; DUARTE et al., 2016 / SILVA et al., 2017).

Uma das suas propriedades mais desejáveis do *L. acidophilus* é a produção de metabólitos antimicrobianos, grandes aliados ao tratamento e prevenção de infecção por patógenos alimentar (SHOKRYAZDAN et al., 2014). A atividade antimicrobiana pode ser devida a formação de bacteriocinas (Quadro 3), ou ainda devido a produção de ácido láctico e/ ou peróxido de hidrogênio (OZOGUL; HAMED, 2016).

Quadro 3. Exemplos de bacteriocinas produzidas por cepas de *Lactobacillus acidophilus*

Bacteriocinas	Peso molecular (Da)	Cepas de <i>L. acidophilus</i>
Lactocina B	6200	<i>Lb. acidophilus</i> N2
Lactacina F	2500	<i>Lb. acidophilus</i> 11088 (NCK88)
Acidocina B	5621.5	<i>Lb. acidophilus</i> M46
Acidofilina 801	<6500	<i>Lb. acidophilus</i> IBB 801
Acidocina D20079	6600	<i>Lb. acidophilus</i> DSM 20079

Fonte: ACEDO et al. (2015); OZOGUL; HAMED (2016).

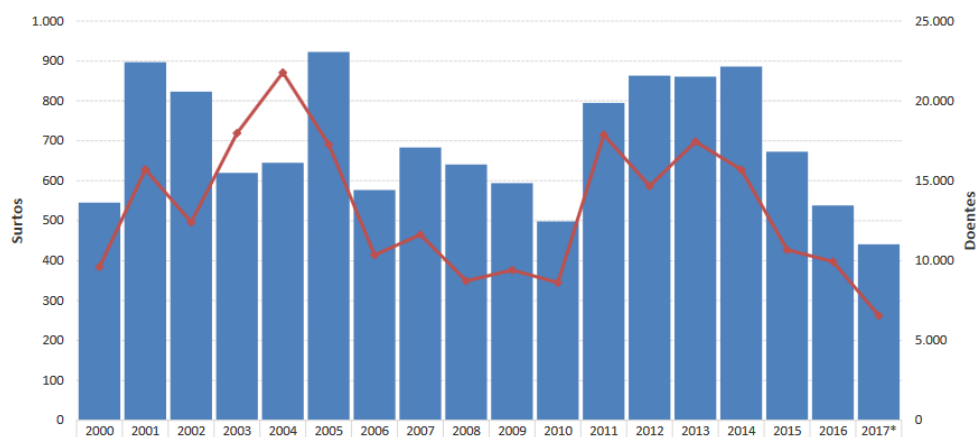
Eissa et al. (2018) estudaram a ação de bacteriocinas produzidas por *L. acidophilus* sobre culturas de *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, inoculados em iogurtes desnatados suplementados com inulina, constatando sua eficiente atividade antifúngica e potencial uso como bioconservante em leites fermentados.

3.3 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, uma doença transmitida por alimentos (DTA) é uma “síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados” (BRASIL, 2018). A transmissão da doença pode ocorrer quando se ingere um alimento contaminado por microrganismos, como bactérias, parasitas e vírus, produtos químicos e toxinas, já a gravidade da enfermidade varia de acordo com a idade e estado do sistema imunológico do indivíduo, dentre outros fatores (FDA, 2019; MA et al., 2018).

As doenças transmitidas por alimentos contaminados podem ocorrer de três formas distintas: infecção (quando há ingestão de alimentos com microrganismos patogênicos), intoxicação (quando há ingestão de alimentos com toxinas) ou toxinfecção (quando ocorre a ingestão de alimentos com microrganismos produtores de toxinas).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, demonstram que entre os anos de 2007 e 2017 foram notificados 12.503 surtos de DTA no Brasil, sendo 236.403 pessoas doentes e uma taxa de mortalidade de 0,08% (Figura 1). Em relação aos agentes etiológicos, 92,2% dos surtos confirmados foram provocados por bactérias, com maior prevalência de *Salmonella*, *Escherichia coli*, e *S. aureus*, respectivamente. Os produtos lácteos estão entre os alimentos mais envolvidos nesses surtos no mundo, sendo relatados em aproximadamente 3% dos casos brasileiros (ARTURSSON et al., 2018; BRASIL, 2018; SILVA et al., 2018).

Figura 1 - Dados de surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2007 e 2017

Fonte: BRASIL (2018a).

O número de doenças de origem alimentar é expressivo até mesmo em países com rigoroso controle de qualidade de alimentos. Nos Estados Unidos, por exemplo, apesar de ter um suprimento de alimentos considerado um dos mais seguros do mundo, estima-se que há uma média de 48 milhões de casos de DTA por ano, atingindo 1/6 da população americana e sendo responsável por aproximadamente 3.000 óbitos naquele país (FDA, 2019; MA et al, 2018).

Atualmente um fato preocupante, quanto ao tratamento das doenças de origem alimentar, está chamando a atenção: a ineficiência dos tratamentos para as pessoas infectadas. O uso excessivo de antibióticos na agricultura e pecuária, adicionados principalmente nas rações nos animais, como as aves, suínos e ruminantes, tem contribuído para a resistência dos microrganismos patogênicos presentes nos alimentos à esses medicamentos. Dados oficiais relatam o crescimento surpreendente do número de doenças provocadas por bactérias resistentes a antibióticos. Diante desse cenário, alternativas de tratamento contra infecção bacteriana, em substituição ao uso de antibióticos, estão sendo estudadas, como por exemplo o uso de bactérias com propriedades probióticas em alimentos, em particular dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LANDERS et al., 2012; MA et al., 2018; WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI, 2018).

Muitos microrganismos, quando presentes nos alimentos, podem causar doenças com significativos efeitos nos consumidores. A dose infecciosa do patógeno depende do tipo de microrganismo e/ou toxinas e do tipo de alimento onde estes estão presentes. A ingestão oral é a principal via de entrada dos organismos patogênicos de origem alimentar, sendo o trato gastrointestinal seu principal local de ação (BHUNIA, 2018;

FORSYTHE, 2013; MUNGROO; OLIVEIRA; NEETHIRAJAN, 2016).

No Quadro 4 são apresentados alguns dos principais microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (BHUNIA, 2018; FORSYTHE, 2013).

Quadro 4. Microrganismos envolvidos com doenças transmitidas por alimentos

Microrganismos	Período de incubação	Duração da enfermidade
Espécies de <i>Aeromonas</i>	Desconhecido	1 a 7 dias
<i>Campylobacter jejuni</i>	3 a 5 dias	2 a 10 dias
<i>Escherichia. coli</i>	16 a 120 horas	2 a 12 dias
<i>Listeria monocytogenes</i>	3 a 70 dias	Variável
Rotavírus	24 a 72 horas	4 a 6 dias
<i>Salmonella</i>	16 a 72 horas	2 a 7 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 a 6 horas	24 horas
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	1 a 3 dias	Variável

Fonte: Adaptado de FORSYTHE (2013); BRASIL (2018b).

Dentre os mais conhecidos microrganismos patogênicos de importância em alimentos, incluindo leite e derivados, destacam-se a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*. (IRSHAD; SULAIMAN; HSIEH, 2017; FORSYTHE, 2013).

A *Salmonella* spp. é a principal responsável por doenças transmitidas por alimentos no mundo, causando cerca de um milhão de casos anualmente somente nos Estados Unidos (CDC, 2013; CDC, 2019). Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, móvel, anaeróbio facultativo e possuem de 2 a 4 µm de tamanho (WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI, 2018; EL-GAZZAR; MARTH, 1992). Pode causar a febre tifóide, febre entérica e salmoneloses, que se caracterizam por dores abdominais, febre e diarreias (GEITENES et al., 2013).

Encontrado com frequência em animais bovinos e excretado nas fezes, este patógeno aparece como relevante contaminante do leite cru, durante as etapas de ordenha e processamento do leite e, em caso de um processamento térmico inadequado e/ou falta de higiene, esta contaminação pode se estender ao produto final e conseqüentemente ao consumidor (SZCZAWIN´SKA; SZCZAWIN´SKI, 2011; FREITAS-NETO et al., 2010).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies, a *Salmonella bongori* e a *Salmonella enterica*, sendo esta última a de maior importância em alimentos. A *S. enterica* é composta por seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*, sendo cada uma destas ainda divididas em diferentes sorotipos (HOLBAN; GRUMEZESCU, 2018; IRSHAD; SULAIMAN; HSIEH, 2017).

A *S. typhimurium*, importante sorotipo da *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, é o segundo sorotipo mais comum encontrados em humanos e responsável por cerca de um terço dos casos mundiais de salmoneloses, com mais de três milhões de mortes anuais relatadas (IBRAHIM et al, 2013; BAGHERYAN et al, 2016). Vários alimentos podem ser fontes de contaminação da *S. typhimurium*, como os produtos lácteos, vegetais, aves, ovos e frutas, constituindo um risco para a saúde pública em todo mundo (IRSHAD; SULAIMAN; HSIEH, 2017; CRUM-CIANFLONE, 2008).

A *Staphylococcus aureus* é produtora de toxina termoestável e está relacionado a surtos de intoxicação, levando a quadros de gastroenterites, que provocam distúrbios como vômito, dor de estômago e diarreia. (ARTURSSON et al., 2018).

Consistem em bactérias Gram-positivas, coagulase positiva, anaeróbios facultativos, não móveis e se apresentam em aglomerados irregulares (*Staphyle*, cacho de uvas) com 0,5-1,0 µm de diâmetro (CASTRO, 2018). Este patógeno não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído por processamentos térmicos moderados como a pasteurização e a cocção do alimentos. Já as suas toxinas, pelo contrário, são muito resistentes ao calor, incluindo tratamento térmico severo como a esterilização (SILVA et al, 2018).

Estima-se que na União Europeia as enterotoxinas estafilocócicas estão envolvidas em aproximadamente 10% dos casos de surtos de intoxicação alimentar (EFSA, 2018). A *Staphylococcus aureus* pode ser encontrado em diferentes matrizes alimentares, como o leite e seus derivados, carnes, frutos do mar e alimentos prontos para o consumo. A contaminação de alimentos por estes microrganismos está associada, principalmente, a falha nos tratamentos térmicos dos alimentos e também de contaminação cruzada durante o processamento (ARTURSSON et al., 2018; CASTRO, 2018; HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Pseudomonas é um gênero de bactérias bastonetes gram-negativos, aeróbicas, catalase positiva, não esporuladas, podendo ser retos ou ligeiramente curvos. A maioria

das espécies dessas bactérias são oxidase positiva e psicrotolerantes, ou seja, são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração. São comumente encontradas no solo, água, animais e vegetais, sendo um dos contaminantes mais comuns na indústria de alimentos. É frequentemente encontrada em produtos alimentícios, associada a deterioração de leite e derivados, carnes, frutos do mar, ovos e vegetais. A espécie mais perigosa que causa infecções em humanos é a *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2017; LIAO, 2006; STARADUMSKYTE; PAULAUSKAS, 2014).

Pseudomonas aeruginosa é considerada um patógeno humano oportunista, capaz de causar doença em indivíduos com sistema imunológico comprometido (PEREIRA; GOMÉZ, 2007). Esses organismos possuem a capacidade de formação de biofilmes, característica que dificulta as tentativas de descontaminação de superfícies em ambientes industriais. Além disso, também apresentam elevada resistência à maioria dos antibióticos, fato complicador no tratamento das doenças. Cerca de 13% das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* nos Estados Unidos são de cepas multirresistentes, sendo responsável por aproximadamente 400 mortes por ano (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; CDC, 2013; GABRIEL et al., 2016).

Pertencente da família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete. É também encontrada no intestino de seres humanos e animais de sangue quente, com capacidade de rápida multiplicação em ambientes com condições ótimas de crescimento (JANG et al., 2017; MUNGROO; OLIVEIRA; NEETHIRAJAN, 2016).

Apesar de algumas cepas de *E. coli* não causar doenças graves transmitidas por alimentos, algumas merecem muita atenção por apresentarem sérios riscos à saúde das pessoas contaminadas. A cepa *E. coli* O157:H7, por exemplo, é altamente infecciosa mesmo a doses muito baixas (50 unidades formadoras de colônia - UFC), além de ser resistente ao calor e ao ácido. Cerca de 10% dos casos de contaminação por *E. coli* evoluem para a síndrome urêmica hemolítica (SUH), cuja taxa de mortalidade fica entre 3 e 7% (FORSYTHE, 2013; NORIS; REMUZZI, 2005; LIM; YOON; HOVDE, 2010; WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI, 2018 2018).

3.4 Microbiologia de alimentos

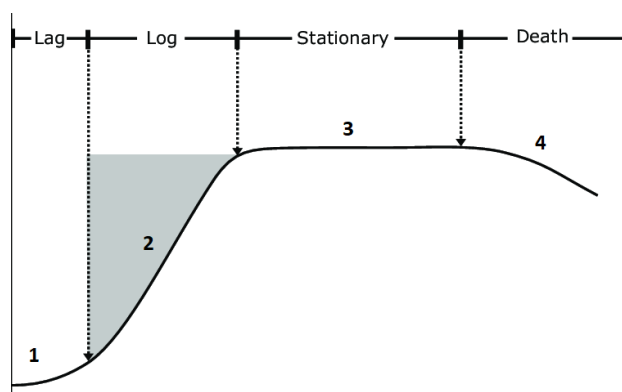
A microbiologia de alimentos é a ciência responsável pelo estudo do comportamento de microrganismos em diferentes matrizes alimentares, assim como os fatores que afetam seu crescimento. Seu objeto de estudo são os organismos de importância em alimentos,

abrangendo os causadores de doenças (patógenos), os envolvidos em deterioração, bem como aqueles desejáveis no processamento, usados para conferir características específicas aos produtos fermentados (FORSYTHE, 2013; JAY, 2005).

O conhecimento de preservação de alimentos surgiu ainda nos tempos da antiguidade. No Egito, há 18.000 anos atrás, já se fazia a secagem dos grãos de cevada, como forma de conservação e inibição de microrganismos deteriorantes (FORSYTHE, 2013). Atualmente os aspectos relacionados à segurança alimentar estão em foco de atenção, uma vez que os casos de intoxicação ainda configuram uma questão grave de saúde pública. Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade do alimento, fazendo com que as empresas mantenham padrões de higiene de excelência, assegurando aos clientes segurança nos seus produtos (SIQUEIRA et al., 2014; JAY, 2005).

O crescimento microbiano é frequentemente representado pela curva de multiplicação bacteriana (Figura 2). A fase lag (1) é caracterizada pela intensa preparação para o crescimento populacional; na fase log (2) ocorre intensa multiplicação microbiana com aumento logarítmico ou exponencial da população; a fase estacionária (3) caracteriza-se pelo equilíbrio entre o número de mortes celular com o número de produção de novos organismos; e na fase de morte (4) ocorre a redução da população em uma taxa logarítmica (KUMAR; MINA, 2017).

Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano típica



Fonte: Adaptado de KUMAR; MINA (2017).

É importante conhecer os fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam as diferentes fases de multiplicação bacteriana, pois determinam se um organismo é capaz de crescer nos alimentos. Em convergência com outras disciplinas, é possível prever com precisão a extensão do crescimento microbiano, conforme observado na microbiologia preditiva. (FORSYTHE, 2013).

3.4.1 Microbiologia preditiva

É crescente a preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos, sobretudo do leite e seus derivados. Doenças alimentares continuam sendo uma grave questão de saúde pública, levando a óbito milhares de pessoas anualmente, principalmente crianças, idosos e pessoas imunodeficientes (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015; LUND, 2015). Neste contexto, métodos de predição de crescimento microbiano através de modelos matemáticos estão sendo estudados.

Os fundamentos da microbiologia preditiva são importantes ferramentas para conhecer e atestar a qualidade microbiológica de produtos alimentícios e avaliar riscos de contaminação (ARROYO-LÓPEZ; BAUTISTA-GALLEGOS; GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2014). Através de equações matemáticas é possível realizar modelagens de predição de crescimento e morte de microrganismos submetidos a determinadas condições ambientais (LONGHI et al., 2013). Com isso, pode-se determinar o tempo de validade de alimentos, assim como conhecer as melhores condições de processamento e armazenamento, além de ser uma ferramenta útil na tomada diária de decisões (ROBAZZA, 2016; TELEKEN et al., 2011).

Estima-se que a microbiologia preditiva surgiu como ciência na década de 1920, mas ficou mais conhecida e aplicada somente nas duas últimas décadas (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). Os parâmetros de predição do comportamento microbiano proporcionam um caminho rápido e relativamente econômico para obtenção de estimativas confiáveis sobre crescimento, inativação e sobrevivência durante a atividade de microrganismos nos alimentos, de acordo com as condições de estocagem (SIQUEIRA et al., 2014). Entretanto é importante observar que são encontradas algumas limitações na microbiologia preditiva, uma vez que a previsão pode ter baixa exatidão e adequação se as condições ambientais forem extrapoladas para além das condições experimentais (FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011).

Ostergaard e colaboradores (2014) estudaram a modelagem de crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo cottage, considerando os efeitos de temperatura, pH, cloreto de sódio (NaCl) e ácidos lácticos e sórbico. Em outra pesquisa, Medved'ová et al. (2018), fez a caracterização e validação de modelagem matemática de crescimento de *E. coli* em produtos derivados de leite cru, em diferentes faixas de temperatura. Savran, Pérez-Rodríguez e Halkman (2017) realizaram a modelagem matemática do comportamento de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* durante a fermentação do iogurte, mostrando que essas bactérias podem sobreviver ao processo de

fermentação do leite mesmo em baixo nível de contaminação.

No Brasil, Araújo e equipe (2017) fizeram um estudo de predição da cinética de crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo coalho, com diferentes combinações de fatores ambientais como temperatura, pH e atividade de água (aw). Nascimento et al. (2018) realizaram um estudo preditivo do crescimento de *Lactobacillus casei* inoculadas em diferentes formulações de leites fermentados tradicionais e sem lactose.

3.4.1.1 Modelos matemáticos

O campo da microbiologia preditiva está em constante expansão e desenvolvimento. Considerando que alimentos são sistemas reais, complexos e não seguem um mecanismo simples, a confiabilidade na aplicação de modelos matemáticos sob estas condições pode ser melhorada através da compreensão dos mecanismos comprometidos no desenvolvimento microbiano (VAN IMPE; VERCAMMEN; VAN DERLINDEN, 2011). Estes modelos estão sendo amplamente utilizados para descreverem a variação de concentração de muitos microrganismos em alimentos lácteos (TELEKEN et al., 2011).

Os modelos matemáticos preditivos são classificados em primários, secundários e terciários. Os modelos primários, Quadro 5, estimam o comportamento de um microrganismo exclusivamente com a variação do tempo, enquanto os modelos secundários descrevem o comportamento dos parâmetros dos modelos primários quando há variação de fatores ambientais, como por exemplo a variação da temperatura do meio. Os modelos terciários são os dependentes de software ou meio eletrônico para calcular os parâmetros de nível primário e secundário (SIQUEIRA et al., 2014; MEZARROBA et al., 2016).

Quadro 5 - Principais modelos matemáticos primários de crescimento microbiológico

Modelo	Equação
Gompertz	$y = y_0 + C \left(e^{-e^{\left(\frac{\mu e(\lambda-t)}{C} + 1\right)}} \right)$
Bifásico	$\log\left(\frac{y}{y_0}\right) = \log[f \cdot e^{(-k_1 t)} + (1 - f)e^{(-k_2 t)}]$
Weibull	$\log\frac{y}{y_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \text{ ou } n = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$
Baranyi e Roberts	$y(t) = y_0 + \mu A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu A(t)} - 1}{e^C}\right)$ $A(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln(e^{-\mu t} + e^{-\mu \lambda} - e^{-\mu(t+\lambda)})$

y: ln da contagem de microrganismos ou absorvância no tempo t; y₀: ln da contagem inicial ou absorvância inicial; μ: taxa de crescimento máxima; λ: tempo da fase lag; t_s: tempo para atingir o estado estacionário; y_{máx}: ln da contagem final ou absorvância final; C: variação entre y_{máx} e y₀; δ: tempo da primeira redução decimal; n: taxa de redução decimal; p: parâmetro de curvatura; f: concentração de células menos resistentes; k₁: taxa de decaimento microbiano da primeira fase; k₂: taxa de decaimento microbiano da segunda fase

Fonte: Adaptado de PLA et al. (2015); MAFART et al. (2002); MCKELLAR et al. (2014).

O modelo de Gompertz e o modelo de Baranyi e Roberts são comumente citados na literatura como as principais equações que se ajustam ao crescimento em nível primário (ARROYO-LÓPEZ; BAUTISTA-GALLEGO; GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2014).

O modelo de Baranyi e Roberts é classificado como empírico, cinético e primário, além disso, é amplamente utilizado na microbiologia preditiva. Este modelo é muito utilizado devido algumas razões: fácil de usar; aplicável a condições com variações dinâmicas no ambiente; apresenta uma boa capacidade de ajuste e a maioria dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (VAN IMPE et al., 2005).

O Modelo de Weibull é um modelo não linear muito utilizado para cálculos de parâmetros cinéticos de inibição de microrganismos, considerando que a curva de inativação microbiana assume um comportamento semilogarítmico (ALVARENGA et al., 2018). O Modelo Bifásico é constituído por duas fases log-lineares, onde a primeira fase corresponde à fração microbiana mais sensível, com taxa de inativação mais alta, e a segunda fase explica o comportamento da parte da população mais resistente, com

menor taxa de decaimento (CERF, 1977; MCKELLAR et al., 2014).

Bednarko-Młynarczyk et al. (2015) publicaram um trabalho de avaliação de diferentes modelos matemáticos na predição de crescimento de *S. aureus* inoculados em iogurte de leite de cabra, armazenados em diferentes temperaturas, concluindo que o modelo de Baranyi e Roberts apresentou o melhor ajuste nos parâmetros analisados. Robazza et al. (2016) utilizaram o modelo de Baranyi e Roberts em seu estudo de modelagem de crescimento de *Salmonella enteritidis* em maionesse adicionada de óleo essencial de orégano. Shinohara et al. (2018) realizaram um estudo de avaliação de modelos matemáticos no crescimento in vitro de *Salmonella typhimurium*, concluindo que a função quadrática apresentou melhor ajuste para descrever seu crescimento cinético.

3.4.1.2 Programas computacionais associados a microbiologia preditiva

O uso de programas computacionais (*softwares*) é uma ferramenta importante da microbiologia preditiva, sendo muito utilizados por pesquisadores acadêmicos e profissionais de saúde e indústria de alimentos (GONZÁLEZ et al, 2019). Vários programas estão disponíveis no mercado e alguns deles são disponibilizados de forma gratuita. Quadro 6 apresenta alguns dos principais *softwares* utilizados no auxílio da predição de crescimento microbiano em alimentos.

Quadro 6 - Principais programas computacionais associados à microbiologia preditiva

Programa	Fonte
ComBase	ComBase Consortium, Agência de Padrões Alimentares - Instituto de Pesquisa Alimentar, (USDA ARS ERRC) http://www.combase.cc/
Pathogen Modeling Program (PMP)	Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA https://www.ars.usda.gov
Seafood Spoilage	Instituto Dinamarquês de Predição do Grupo de Microbiologia da Investigação Pesqueira (SSP) http://sssp.dtuaqua.dk/
THERM	Centro de Validação de Processos de Carne da Universidade de Wisconsin http://www.meathaccp.wisc.edu/THERM/Calc.aspx
Bacanova Project	Programa Quadro V da Comissão Europeia http://www.ifr.ac.uk/bacanova/default.html

Fonte: Adaptado de ANASTÁCIO (2009)

O Pathogen Modeling Program (Programa de Modelagem de Patógenos) é um *software* disponibilizado pelo Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS). O programa possui um banco de dados e modelos que pode ser usado para prever o crescimento e a inativação de microrganismos transmitidos por alimentos, principalmente patógenos, sob várias condições ambientais, incluindo a temperatura, pH e concentração de sal (USDA, 2016).

Existem ainda algumas pesquisas sobre desenvolvimento de programas para aplicação em predição de crescimento microbiano em alimentos. Siqueira et al. (2014) desenvolveram um *software* chamado Microfit, voltado para o ajuste de dados experimentais a modelos matemáticos pré-definidos e, segundo os autores, o programa “permite a criação, montagem e ajuste de novo modelos de uma maneira fácil e acessível aos profissionais”. González et al. (2019) apresentaram o MicroHibro, um *software* de

base de dados própria para aplicação em microbiologia preditiva, com o diferencial de possuir uma estrutura flexível, com sistema de importação, que permite a incorporação de novos modelos matemáticos de outros programas.

3.4.1.3 Validação estatística

Na modelagem preditiva é fundamental a validação estatística. Esta etapa permite comparar os dados obtidos experimentalmente com os valores teóricos, previstos pelos modelos matemáticos. Através dos cálculos dos erros é possível conhecer a confiabilidade do modelo matemático, ou seja, se o modelo reproduz bem o crescimento ou inibição microbiana no alimento nas condições experimentais. Os principais índices estatísticos utilizados na validação estatísticas dos modelos matemáticos são: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator *bias* e fator exatidão (SIQUEIRA et al., 2014; ROSS, 1996).

O coeficiente de determinação (R^2), Equação 1, é uma quantificação que indica o quanto o modelo é capaz de explicar os dados observados. Este índice varia de 0 a 1, no qual o 0 indica que o modelo matemático não explica o comportamento de dependência das variáveis, e 1 (desejável) indica que o modelo explica esta dependência com perfeição (MONTGOMERY; RUNGER; HUBELE, 2014).

$$R^2 = 1 - \frac{SQ_R}{SQ_T} = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: SQ_R corresponde à soma quadrática dos resíduos; SQ_T é soma quadrática total; \hat{y}_i e y_i correspondem aos valores de y para um mesmo valor de x , sendo o primeiro calculado através do modelo obtido e o segundo determinado através do experimento; e \bar{y} corresponde ao valor experimental médio de y , ou seja, o somatório de y_i dividido pelo número de amostras.

O erro médio quadrático (MSE) e sua respectiva raiz (RMSE), Equação 2, é a diferença entre o valor observado e o valor estimado e, quanto mais próximo de zero o valor do coeficiente MSE for, mais adequado é o modelo analisado (DOROTA et al., 2014; ROSS, 1996).

$$RMSE = \sqrt{MSE} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: y_i e \hat{y}_i correspondem aos mesmos fatores da Equação 1; n é o número de pontos experimentais; e p é o número de parâmetros avaliados no modelo

O Fator bias, Equação 3, é o índice que determina se os valores experimentais estão acima ou abaixo da linha estimada, indicando o quanto, em média, um modelo superprediz (fator bias > 1) ou subprediz (fator bias <1) os dados observados (DOROTA et al., 2014; ROSS, 1996).

$$Fator\ bias = 10^{\frac{\sum_1^n \log\left(\frac{\hat{y}_i}{y_i}\right)}{n}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: n , \hat{y}_i e y_i correspondem aos mesmos fatores explicados para as Equações 1 e 2.

O fator exatidão (Equação 4) indica o desvio médio do valor observado para o valor previsto e mede a eficácia do modelo de predição, indicando o quão ajustado está em relação aos dados experimentais. Quanto mais próximo de 1, melhor é o modelo (TIWARI et al., 2014; ROSS, 1996).

$$Fator\ exatidão = 10^{\frac{\sum_1^n \left| \log\left(\frac{\hat{y}_i}{y_i}\right) \right|}{n}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde os coeficientes correspondem aos apresentados anteriormente para as Equações 1, 2 e 3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAD. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS DIETÉTICOS E PARA FINS ESPECIAIS. São Paulo, 2016. Abiad. Disponível em: <<http://www.abiad.org.br>>. Acesso em 20 jul de 2019.

ACEDO, J. Z.; VAN BELKUM, J. Z.; LOHANS, C. T.; MCKAY, R. T.; MISKOLZIE, M.; VEDERAS, J. C. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 81, p. 2910-2918, 2015.

ALVARENGA, V. O.; CAPPATO, L. P.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Aspectos quantitativos de segurança de produtos lácteos: microbiologia preditiva e avaliação quantitativa de riscos. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Elsevier, p. 145-167, 2018.

ALVAREZ-ORDÓÑES, A.; BROUSSOLLE, V.; COLIN, P.; NGUYEN-THE, C.; PRIETO, M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 99–109, 2015.

ANASTÁCIO, A. Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. **Segurança e Qualidade Alimentar**, n. 7, p. 56-59, 2009.

ARAÚJO, V. G.; ARRUDA, M. D. O.; DUARTE, F. N. D.; DE SOUZA, J. M. B.; LIMA, M. C.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; SCHAFFNER, D. W.; DE SOUZA, E. L. Predicting and Modelling the Growth of Potentially Pathogenic Bacteria in Coalho Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1172-1181, 2017.

ARENA, M. P., CAGGIANIELLO, G., RUSSO, P., ALBENZIO, M., MASSA, S., FIOCCO, D., SPANO, G. (2015). Functional starters for functional yogurt. **Foods**, v. 4, p. 15–33, 2015.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. **Role of predictive microbiology in food preservation**. In: BHAT, R.; ALIAS, A.K.; PALIYATH, G. **Progress in Food Preservation**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2012.

ARTURSSON, K.; SCHELIN, J.; LAMBERTZ, S. T.; HANSSON, I.; ENGVALL, E. O. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 120-127, 2018.

BAGHERYAN, Z.; RAOOF J.; GOLABI, M.; TURNER, A. P. F.; BENI, V. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella typhimurium* in food sample, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 566-573, 2016.

BEDNARKO-MŁYNARCZYK, E.; SZTEYN, J.; BIAŁOBRZEWSKI, I.; WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, A.; LIEDTKE, K. Modeling the kinetics of survival of *Staphylococcus aureus* in regional yogurt from goat's milk. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, n. 18, p. 39-45, 2015.

BELTRÁN, M. C.; BERRUGA, M. I.; MOLINA, A.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA M. P. Performance of the current microbial tests for screening antibiotic in sheep and goat milk. **International Dairy Journal**, n. 41, p. 13-15, 2015.

BHUNIA, A.K. General Mechanism of Pathogenesis. In: **Foodborne Microbial Pathogens. Food Science Text Series**. New York: Springer, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, p. 5. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, p. 97. Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018a. Disponível em

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em 30 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agentes etiológicos, 2018b. Disponível em <https://www.saude.gov.br/component/content/article/932-saude-de-a-a-z/doenca-diarreica-aguda-dda/43215-agentes-etiológicos>. Acesso em 17 mar. 2020.

BREIDENSTEIN, E. B.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v.19, p.419–426, 2011.

CASTRO, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Staphylococcus aureus, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. **Foodborne Diseases**. Academic Press, p. 564, 2018.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Salmonella surveillance annual report, 2013. US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare, 2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>>. Acesso em 18 jul de 2019.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Salmonella, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em 13 jul. 2019.

CERF, O. Tailing of survival curves of bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.42, p. 1-19, 1977.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160–166, 2018.

CIVIDINI, A.; GANTNER, V.; KUTEROVAC, K.; POTOČNIK, K. Composition and Protein Fraction in Comparison with Different Milk Species. **Mijekarstvo**, v. 61, n. 2, p.107-113, 2011.

CLARK, S.; MORA, M. G. A 100-year review: advances in goat milk research. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10026-10044, 2017.

CORDEIRO, A. G. P. C.; CORDEIRO, P. R. C. **A Produção de leite de cabra no Brasil e seu mercado**. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana. Espírito Santo do Pinhal, SP, 2009. p. 1-6.

COSTA, M. P.; FRASAO, B. S.; SILVA, A. C. O.; FREITAS, M. Q.; FRANCO, R.M.; CONTE-JUNIOR, C. A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 5995-6003, 2015.

CRUM-CIANFLONE, N. F. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. **Current Gastroenterology**, v. 10, 424–431, 2008.

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C.; SOUZA, C. H.; FARIA, J. A.; SAAD, S. M. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 344-354, 2009.

DOROTA, Z.; DANUTA, K.; ANTONI, G.; MOTYL, I. Predictive Modelling of *Lactobacillus casei* KN291 Survival in Fermented Soy Beverage. **Journal of Microbiology**, v.52, p.169–178, 2014.

DUARTE, M.C.K.H.; CORTEZ, N.M.S.; CORTEZ, M.A.S.; FRANCO, R.M.; MACEDO, N.C. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA JOURNAL**, v. 16, p. 1-262, 2018.

EISSA, S. A.; ELBARBARY, H. A.; IBRAHIM, E. M. A.; MOHAMMED, H. A. Growth Pattern of Starter Cultures and Antifungal Activity of Some Bacteriocins and Inulin in Skim Milk Yoghurt. **Journal of Veterinary Sciences**, v. 59, p. 17-25, 2018.

EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E.H. Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, n. 75, p. 2327–2343, 1992.

EMBRAPA. Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro – **Anuário Leite 2018**, EMBRAPA, 201, 114p. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>. Acesso em 15 de jul. 2019.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R. M.; MANNAN, K, S, B. Predictive Microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science (Biological Science)**, v.4, p.121-131, 2011.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations database. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>> Acesso em 23 jul de 2018.

FAZILAH, N, F.; ARBAKARIYA, B. A.; MOHD, E. K.; LEONARDO, R.; MURNI, H. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v.48, p.387–399, 2018.

FDA – U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogens, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>. Acesso em 20 jul. 2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FREITAS-NETO, O. C.; PENHA-FILHO, R. A. C.; BARROW, P.; BERCHIERI, J. A. Sources of human non-typhoid Salmonellosis: A review. **Brazilian Journal of Poultry Science** v.12, p. 01–11, 2010.

GABRIEL, A. A.; UGAY, M. C. C. F.; SIRINGAN, M. A. T.; ROSARIO, L. M. D.; TUMLOS, R. B.; RAMOS H. J. - Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.36, p.311–319, 2016.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresentado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo. **Ciências Exatas e Naturais**, v.15, n.1, 2013.

GETANEH, G.; MEBRAT, A.; WUBIE, A.; KENDIE, H. Review on Goat Milk Composition and Its Nutritive Value. **Journal of Nutrition and Health Sciences**, v. 3, p. 1-10, 2016.

GONZALÉZ, S. C.; POSSAS, A.; CARRASCO, E.; VALERO, A.; BOLÍVAR, A.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F. 'MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. **International Journal of Food Microbiology**, n. 290, p.226-236, 2019.

GURSEL, A.; GURSOY, E. A. K.; BUDAK, S. O.; AYDEMIR, S.; DURLU-OZKAYA, F. Role of milk protein-based products in some quality attributes of goat milk yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, 2016.

HELLER, L. (2009). Regulation and health claims for functional foods, 2009. Disponível em <http://www.nutraingredients-usa.com/Regulation/Regulation-and-health-claims-for-functionalfoods>. Acesso em 20 jul. 2019.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 815–836, 2012.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., CALDER, P. C. (2014). Expert consensus document, The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. **Foodborne Diseases**. Academic Press, p. 564, 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 27 nov. 2018.

IBRAHIM, S. A.; ASAKIR, S. F.; IDRIS, A. A. MARTINEZ-URTAZA, J.; ELSAFI, H. H. Prevalence of *Salmonella* species among asymptomatic food handlers in

Khartoum State, Sudan. **British Journal of Biomedical Science**, v. 70, p. 88–89, 2013.

IRSHAD, M.; SULAIMAN; HSIEH, Y. Foodborne Pathogens in Milk and Dairy Products: Genetic Characterization and Rapid Diagnostic Approach for Food Safety of Public Health Importance. In: WATSON, R. R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. **Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan**, Academic Press, p. 460, 2017.

JANG, J.; HUR, H. G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T. ISHII, S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 570-581, 2017.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.

JIA, R.; CHEN, H.; CHEN, H.; DING, W. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.99, p. 1–7, 2015.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2016.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 26, p. 927-939, 2018.

KHAN, S. U. Probiotics in dairy foods: a review. **Nutrition & Food Science**, v.44, p.71-88, 2014.

KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; HEIMBACH, J.; BAÑARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; Lalonde, M. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v.32, p.99-103, 2015.

KUMAR, P.; MINA, U. Life Sciences, Fundamentals and Practice, Part I. 6.ed. New Delhi: Pathfinder Publication, 2017.

LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Rep**, v.127, p.4-22, 2012.

LIAO, C. H. Pseudomonas and related genera. In: BLACKBURN, C. **Food Spoilage Microorganisms**. Woodhead, Cambridge, p. 507–540, 2006.

LIM, J. Y.; YOON, J. W.; HOVDE, C. J. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. **Journal Microbiol Biotechnol**, v.20, p.5-14, 2010.

LUND, B. M. Microbiological food safety for vulnerable people. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 12, p. 10117–10132, 2015.

MA, Y.; DING, S.; FEI, Y.; LIU, G.; JANG, H.; FANG, J. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens Escherichia coli and Salmonella. **Food Control**, v.106, 2019.

MACHADO, T. A. D. G.; OLIVEIRA, M. E. G. D.; CAMPOS, M. I. F.; ASSIS, P. O. A. D.; SOUZA, E. L. D.; MADRUGA, M. S. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107-113, 2002.

MARCO, M. L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D.; FOLIGNE, B.; SMID, E. J. Health benefits of fermented foods, microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MARTÍN, E. R.; ESCOBAR, E. G.; DE ADANA, R.; RUBIO, F. L.; PELAEZ, L.; CARACUEL, A. M.; SILVA, F. J. B.; SORIGUER, F.; MARTINEZ, G. R.; OLVEIRA, G. Comparison of the Effects of Goat Dairy and Cow Dairy Based Breakfasts on Satiety, Appetite Hormones, and Metabolic Profile. **Nutrients**, v.9, n. 877, p. 1-13, 2017.

MCKELLAR, R. C.; PERÉZ-RODRÍGUEZ, F.; HARRIS, L. J.; MOYNE, A.; BLAIS, B.; TOPP, E.; BEZANSON, G.; BACH, S.; DELAQUIS, P. Evaluation of different approaches for modeling *Escherichia coli* O157:H7 survival on field lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 184, p. 74-85, 2014.

MEDVED`OVÁ, A.; ROSSKOPF, F. LIPTÁKOVÁ, D. VALÍK, L. Prediction of temperature effect on growth of two raw milk cheese isolates of *Escherichia coli* in milk. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 57, 2, p. 141–150, 2018.

MEIRA, Q. G. S.; MAGNANI, M.; JÚNIOR, F. C. M.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MADRUGA, M. S.; GULLÓNE, B.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; SOUZA, E. L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.76, p.828-838, 2015.

MELLENTIN, B; HEASMAN, M. **The Functional Foods Revolution: Healthy People, Healthy Profits. London:** Routledge, p.334, 2014.
monas.html. Acesso em 21 jul. 2019.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G.; HUBELE, N. F. *Estatística Aplicada à Engenharia*, 2 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2014.

MORELLI, L. Yogurt, living cultures, and gut health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p.1248S-1450S, 2014.

MUNGROO, N. A.; OLIVEIRA, G.; NEETHIRAJAN, S. SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens. **Microchimica Acta**, v. 183, p. 697-707.

NASCIMENTO, I. R. S.; XIMENES, G. N. C.; MENEZES, M. U. F. O.; FRANÇA, C. L. O.; SANTOS, C. S.; CORTEZ, N. M. S. Predictive modeling of the growth/survival

of de *Lactobacillus casei* inoculated in traditional and lactose free fermented milk drinks. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Anais CBCTA, Belém, 2018.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Hemolytic uremic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. 1035-1050, 2005.

OSTERGAARD, N. B.; EKLOW, A.; DALGAARD, P. Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter- and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p.15–25, 2014.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015.

PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and gastrointestinal conditions. An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition Journal**, v. 45, p. 125–134, 2018.

PEREIRA, R. N.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G. Ohmic heating for the dairy industry: a potential technology to develop probiotic dairy foods in association with modifications of whey protein structure. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 95-101, 2018.

PEREIRA, V. G.; GOMÉZ, R. J. H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. **Predictive microbiology in foods**. Nova Iorque: Springer, 128 p., 2013.

PLA, M.; OLTRA, S.; ESTEBAN, M.; ANDREU, S.; PALOP, A. Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

PULINA, G.; MILÁN, M. J.; LAVÍN, M.P.; THEODORIDIS, A.; MORIN, E.; CAPOTE, J.; CAJA, G. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors, **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 6715-6729, 2018.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RANADHEERA, C. S.; VIDANARACHCHI, J. K.; ROCHA, R. S., CRUZ, A. G., AJLOUNI, S. Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages. **Fermentation**, v. 3, p. 1-17, 2017.

ROBAZZA, W. S.; DACOREGGIO, M. V.; GALVÃO, A. C.; SCHITTLER, L. Modelagem do Crescimento de *Salmonella Enteritidis* em Maionese Adicionada de Óleo Essencial de Orégano. **Vetor**, Rio Grande, v. 26, p. 51-60, 2016.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology** 81, 501-508, 1996.

SANGAMI, R.; SRI, S. R. Emerging trends in improving viability, advanced stability techniques and health claims of healthy microbiome—The probiotics. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 194–200, 2017.

SAVRAN, D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; HALKMAN, A. K.; Modeling the survival of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* during the fermentation of yogurt, **Food Science and Technology International**, v. 0, p. 1–7, 2017.

SHINOHARA, N. K. S.; FREITAS, F.; PIRES, E. F.; ANDRADE, S. A. C.; FILHO, J. L. L.; SOUSA, P. H. M. Statistical evaluation of mathematical models for *Salmonella typhimurium* growth, **Revista Geama**, v. 4, p. 33-38, 2018.

SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C. C.; KALAVATHY, R.; LIANG, J. B.; ALITHEEN, N. B.; JAHROMI, M. F.; HO, Y. W. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

SILVA, A. J. H.; ANJOS, C. P.; NOGUEIRA, L. S.; RIBEIRO, A. C. R.; FRAGA, E. G. S. *Salmonella* spp. um agente patogênico veiculado em alimentos. **Revista Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 5, p.1-7, 2018.

SILVA, F. A.; ELIEIDY, G. O.; FIGUEIRÊDO, M. F.; SAMPAIO, K. B.; SOUZA, E. L.; DE OLIVEIRA, C. E. V.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA, R. C. R. E. 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, 2017a.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. R.; TANIWAKE, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 5. ed. São Paulo, SP: Blucher, 2017b. 535 p.

SIQUEIRA, A. A.; CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. Microfit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. **Brazilian journal of food technology**. v. 17, n. 4, p. 329-339, 2014.

SIQUEIRA, K, B. Leite e derivados: tendências de consumo. In: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro – **Anuário Leite 2018**, EMBRAPA, 114p. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>. Acesso em 15 jul. 2019.

SIVIERI, K.; FREIRE, F. C.; LOPES, N. P.; SHIRAIISHI, C. T. D.; PIRES, A. C. M. S.; LIMA, A. C. D; ZAVARIZI, A. C. M.; SGARBOSA, L.; BIANCHI, F. **Synbiotic**

Yogurts and the Elderly. Chapter 14 – Yogurt in Health and Disease Prevention, p. 259–271, 2017.

STARADUMSKYTE, D.; PAULAUSKAS, A. Non-Fermentative Gram-Negative Bacteria in Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection** v. 6, p. 114-119, 2014.

STARADUMSKYTE, D.; PAULAUSKAS, A. Non-Fermentative Gram-Negative Bacteria in Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection** v. 6, p. 114-119, 2014.

SZCZAWIN´SKA, M. E.; SZCZAWIN´SKI, J. (2011). Effect of storage temperature on survival rate of Salmonella Enteritidis in yoghurt. **Analele Universita˘tii din Craiova, seria Agricultura˘ – Montanologie – Cadastru**, v. 41, p. 243–246, 2011.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. S; GOMES, G. A. **Mathematical modeling of microbial growth in milk.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 31, n. 4, p. 891-896, 2011.

THUM, C.; COOKSON, A.; MCNABB, W. C.; ROY, N. C.; OTTER, D. Composition and enrichment of caprine milk oligosaccharides from New Zealand Saanen goat cheese whey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 30-37, 2015.

TIWARI, U.; WALSH, D.; RIVAS, L.; JORDAN, K.; DUFFY, G. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. **Food Control**, v. 42, p. 248-256, 2014.

TONUCCI, L. B.; DOS SANTOS, K. M. O.; DE OLIVEIRA, L. L.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 85-92.

TOUALBIA, M.; BOURAS, A. E. D.; KOICHE, M.; KERKLOUD, M. Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus plantarum* from camel milk and its antagonist effect against diarrheal bacteria. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, p. 283-287, 2018.

USDA – U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Residue Chemistry and Predictive Microbiology Research, 2016. Disponível em <<https://www.ars.usda.gov/northeast-area/wyndmoor-pa/eastern-regional-research-center/residue-chemistry-and-predictive-microbiology-research/docs/pathogen-modeling-program/pathogen-modeling-program-getting-started/>>. Acesso em 20 jul. 2019.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

VAN IMPE, J. F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Developing next generation predictive models: a systems biology approach. In: TAOUKIS, et al. **11th International Congress on Engineering and Food**, Atenas, Grécia. p. 465-466, 2011.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE. Probiotics: An update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 6–21, 2015.

VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S.; Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 243-257, 2019.

WAN, M. L. Y.; FORSYTHE, S. J.; EL-NEZAMI, H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.5, p.1-14, 2018.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probiotics and fermented dairy foods: a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, p.49-57, 2013.

WONG, A. Y.; LAI, J. M. C.; CHAN, A. W. Regulations and protection for functional foodproducts in the United States. **Journal of Functional Foods**, v.17, p.540–551, 2015.
YERLIKAYA, O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 221-229, 2014.

ZOUMPOPOULOU, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E.; PAPADIMITRIOU, K. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 46-60, 2016.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1: ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* EM IOGURTE INTEGRAL DE LEITE DE CABRA

RESUMO

É crescente a produção de derivados lácteos caprino, em especial de iogurtes funcionais, devido as vantagens nutricionais e tecnológicas deste alimento. A incorporação de probióticos aos leites fermentados é benéfico à saúde do consumidor, sendo importante conhecer a viabilidade desses microrganismos no produto, desde a produção até o consumo final. Esta pesquisa teve como objetivo fazer um estudo preditivo do comportamento da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 durante as etapas de fermentação e estocagem de iogurte integral de leite de cabra, durante 35 dias, através de contagens seletivas de *L. acidophilus* em meio MRS adicionado do antibiótico clindamicina. Os dados experimentais foram ajustados ao modelo primário de regressão não-linear de Baranyi e Roberts, com auxílio do software DMFit 3.5. A avaliação estatística foi realizada por meio dos parâmetros estatísticos (R^2 , RMSE, fator bias e fator exatidão) e análise de variância (ANOVA) e Test-t, com uso do Statistica 7.0. O tempo total de fermentação do iogurte foi de 6,5h, na qual se observou um crescimento das células probióticas de 3 ciclos logarítmicos. Durante o armazenamento a 4 °C, o tempo influenciou na concentração de *L. acidophilus* apenas a partir do 30º dia, mantendo a contagem mínima de 10^6 UFC/g durante todo período. O modelo de Baraniy e Roberts apresentou bom ajuste aos dados observados, com coeficiente de regressão $> 0,97$ e erro quadrático médio (RMSE) próximo de zero, para ambas as etapas do estudo. Este conhecimento beneficia as indústrias de laticínios quanto à otimização e confiabilidade dos seus processos.

Palavras-chave: modelagem; Baranyi e Roberts; viabilidade microbiana

ABSTRACT

The production of goat dairy products, especially functional yoghurt, is increasing due to the nutritional and technological advantages of this food. The incorporation of probiotics in fermented milks is beneficial to consumer health, and it is important to know the viability of these microorganisms in the product, from production to final consumption. This research aimed to make a predictive study of the behavior of the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 during the stages of fermentation and storage of goat's milk, yoghurt during 35 days by selective counting of *L. acidophilus* in MRS medium added from antibiotic clindamycin. The experimental data were adjusted to the primary nonlinear regression model of Baranyi and Roberts, with the aid of DMFit 3.5 software. Statistical evaluation was performed using statistical parameters (R^2 , RMSE, bias factor and accuracy factor) and analysis of variance (ANOVA) and T-Test, using Statistica 7.0. The total fermentation time of the yogurt was 6.5h, in which probiotic cell growth of 3 logarithmic cycles was observed. During storage at 4 °C, time influenced the concentration of *L. acidophilus* only from the 30th day, keeping the minimum count of 10^6 CFU / g throughout the period. The Baranyi and Roberts model presented good fit to the observed data, with regression coefficient > 0.97 and mean square error (RMSE) close to zero, for both stages of the study. This knowledge can benefit dairy industries in optimizing and reliability their processes.

Keywords: modeling; Baranyi and Roberts; microbial viability

4.1 INTRODUÇÃO

É crescente o desenvolvimento de produtos lácteos derivados do leite de cabra, a exemplo de iogurtes, bebidas lácteas e queijos, como forma de minimizar e mascarar o *flavour* característico do leite de cabra e tornar os produtos mais atrativos ao paladar do consumidor (MACHADO et al., 2017; EMBRAPA, 2018). Uma maior demanda por alimentos hipoalergênicos e funcionais também está contribuindo para o aumento de produção de derivados de leite caprino, principalmente do iogurte (FAZILAH et al., 2018; RANADHEERA, NAUMOVSKI, AJLOUNI, 2018).

A espécie *Lactobacillus acidophilus* é uma das mais utilizadas em alimentos e destaca-se por sobreviver a meios mais ácidos que outros microrganismos probióticos. Uma das suas propriedades mais desejáveis é a produção de metabólitos antimicrobianos, grandes aliados ao tratamento e prevenção de infecção por patógenos alimentar (DUARTE et al., 2016; SILVA et al., 2017; SHOKRYAZDAN et al., 2014).

Nos últimos anos tem crescido o interesse no estudo da cinética de sobrevivência de espécies probióticas, aplicado a diferentes condições ambientais e matrizes alimentares (NIKMARAM, et al., 2015). A microbiologia preditiva é a ciência que permite obter parâmetros de predição de comportamento de microrganismos nos alimentos, proporcionando um caminho rápido e confiável para o conhecimento sobre crescimento, inativação e sobrevivência microbiana em condições específicas (SIQUEIRA et al., 2014).

Considerando que alimentos são sistemas reais, complexos e não seguem um mecanismo simples, modelos matemáticos estão sendo amplamente utilizados para descreverem a variação de concentração de muitos microrganismos em alimentos lácteos (VAN IMPE; VERCAMMEN; VAN DERLINDEN, 2011). O modelo de Baranyi e Roberts é classificado como empírico, cinético e primário, além disso, é amplamente aplicado na microbiologia preditiva. Este modelo é muito utilizado devido algumas razões, dentre elas a facilidade de aplicação e elevada capacidade de ajustes, mesmo com variações dinâmicas ambientais, além de possuir parâmetros biologicamente interpretáveis, o que facilita a compreensão (VAN IMPE et al., 2005).

Apesar de estar mais associada à qualidade microbiológica e risco de contaminação de alimentos, através da predição de crescimento de patógenos e deteriorantes (TELEKEN et al., 2011), a microbiologia preditiva também pode ser uma importante aliada no estudo do comportamento de células probióticas, como as bactérias

láticas, presentes em leite e seus derivados. Combinando a modelagem matemática com os dados experimentais, é possível obter dados importantes sobre a dinâmica de crescimento dos probióticos nas condições estudadas, ajudando na otimização do processo de fabricação do alimento, assim como estimar o prazo de viabilidade funcional do mesmo (MEDVEĐOVÁ; MANČUŠKOVÁ; VALÍK, 2016).

Esta pesquisa teve o objetivo de estudar a viabilidade da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 em condições isotérmicas, durante a fermentação de iogurte integral de leite de cabra, a 43 ± 1 °C, e durante o seu armazenamento a 4 ± 1 °C, por 35 dias, através dos ajustes de dados para o modelo primário de Baranyi e Roberts.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

As matérias-primas utilizadas para a produção do iogurte de leite de cabra tradicional foram: leite de cabra em pó integral (Cappry's®), culturas iniciadoras de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* DELVO YOG CY 340 (Globalfood), cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 (Globalfood) do tipo DVS (*Direct Vat Set*), açúcar refinado (União®) e água mineral (Indaiá®). Para os ensaios microbiológicos foram utilizados os meios de cultura Agar Man Rogosa & Sharpe (MRS) (Merck), caldo Man Rogosa & Sharpe (MRS) (Merck), solução salina peptonada (0,1%) e o antibiótico cloridrato de clindamicina (C₁₈H₃₃N₂ClO₅S) (Sigma-Aldrich).

As culturas iniciadoras e probiótica foram gentilmente cedidas pela empresa Globalfood®. Os insumos microbiológicos e reagentes químicos foram adquiridos em lojas especializadas e também direto com os fabricantes. Os demais ingredientes foram adquiridos em supermercados e comércios localizados na região metropolitana do Recife-PE.

4.2.2 Preparo da cultura de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10

As cepas das culturas iniciadoras de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Globalfood) e da probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, obtidas a partir das amostras comerciais liofilizadas, foram preparadas em concentração de 10^{12} UFC/mL em leite desnatado reconstituído, previamente esterilizado em autoclave a 110 ± 1 °C por 10 minutos, em volumes de 10 mL em tubos Falcon

(Figura 1), posteriormente armazenados a -22 ± 1 °C, conforme procedimento operacional (POP) do Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia Química da UFPE (Anexo 1).

Figura 1 - Culturas de *L. acidophilus* LAFTI L10 ativadas em leite desnatado reconstituído



Fonte: O autor.

No dia anterior à produção do iogurte, as culturas lácticas foram descongeladas pelo processo *overnight*, em geladeira, à temperatura entre 4 °C \pm 1 °C. Em seguida, para que as mesmas fossem ativadas, foram incubadas por aproximadamente 6 horas em estufa incubadora BOD (Tecnal®) a 37 °C \pm 1 °C.

4.2.3 Produção do iogurte integral de leite de cabra

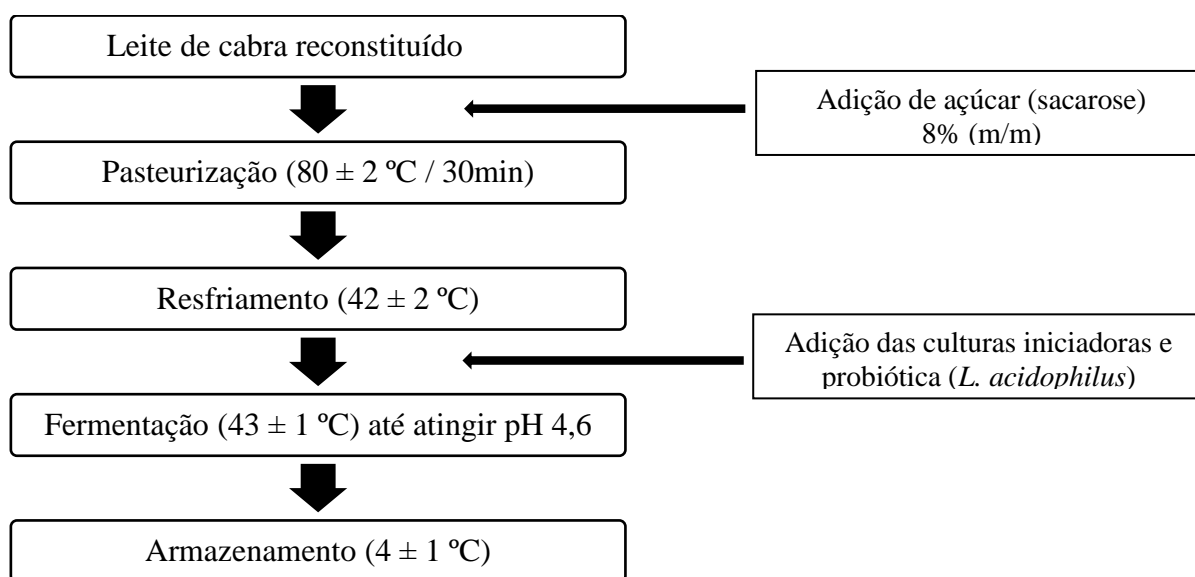
A produção do iogurte integral de leite de cabra seguiu metodologia (adaptada) de Costa et al. (2014). Esta foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do prédio de Engenharia de Alimentos, localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

O leite de cabra integral em pó foi reconstituído conforme instrução do fabricante: pesou-se 250g em balança semi-analítica (Ramuza®) e diluiu-se em água mineral morna até completar 2000 mL de leite fluido. O conteúdo foi então transferido para um recipiente e recebeu a adição do açúcar, na concentração de 8% (m/m), e foi homogeneizada. Em seguida, em fogão industrial, foi realizado o tratamento térmico por 30 minutos e temperatura de 80 ± 2 °C (pasteurização lenta).

A etapa seguinte foi a de refrigeração, realizada em cuba de aço inox com água gelada e cubos de gelo, com monitoração térmica do leite pasteurizado, até chegar aos 42

± 1 °C. Foram então adicionadas as culturas iniciadoras de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e a cultura de *L. acidophilus*, ambas na concentração de 1% (v/v), a partir da suspensão previamente preparada. Por fim, a mistura foi igualmente dividida em 6 potes de vidro estéreis e levada à fermentação a 43 ± 1 °C em estufa bacteriológica (Fanem®). Durante esta etapa foi realizado o acompanhamento de pH e acidez das amostras em intervalos de 1h, em triplicata, até atingir valores de 4,6 e 0,65 (% de ácido lático), respectivamente, momento em que as amostras foram retiradas da estufa e armazenadas em geladeira 4 ± 1 °C. Um esquema simplificado da produção do iogurte integral de leite de cabra é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema simplificado da produção de iogurte integral de leite de cabra



Fonte: O autor.

4.2.4 Ensaio físico-químico

Os ensaios físico-químicos seguiram os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal sugeridos pela Instrução Normativa nº68/2006 (BRASIL, 2006), e foram realizados no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia Química (UFPE).

Os ensaios de pH e acidez foram realizados em intervalos de 1 hora na etapa de fermentação do iogurte (Etapa I) e em intervalos de 5 dias após a produção, no período total de 35 dias (Etapa II). Os ensaios de matéria gorda, proteínas, cinzas e umidade foram realizados após cinco dias de produção, com objetivo de conhecer a composição centesimal do iogurte produzido e compará-lo com a legislação brasileira para leites fermentados (Instrução Normativa nº 46 de 2007).

4.2.4.1 pH

A aferição do pH foi realizada utilizando-se o pH-metro digital de bancada (*Tecnal*®), previamente calibrado em soluções tampão de pH 4 e 7, pela imersão do potenciômetro em 50 mL da amostra de iogurte.

4.2.4.2 Acidez

A técnica consiste em neutralizar com solução Dornic (NaOH N/9) 10,0 mL da amostra contendo fenolftaleína 1% como indicador. Cada 1 mL de solução Dornic gasta na titulação correspondeu a acidez de 0,1%, expresso em ácido láctico.

4.2.4.3 Lipídios: método de Gerber

Para avaliar a gordura, foram adicionados 10 mL da solução de ácido sulfúrico 1M ao butirômetro de Gerber, seguido de 1 mL da amostra e 1 mL de álcool isoamílico. Depois de agitar para homogeneizar os líquidos, foi realizada a centrifugação a 5 mil rpm durante 5 minutos e leitura direto na escala, em %.

4.2.4.4 Proteínas (nitrogênio total)

O conteúdo proteico (nitrogênio total) foi obtido pelo método de Kjeldahl, que consiste na digestão com ácido sulfúrico, aumentando a temperatura gradativamente até atingir 400 °C, com posterior destilação do ácido bórico e hidróxido de sódio a frio, titulação com ácido clorídrico e determinando, indiretamente, usando o fator de correção (F=6,38).

4.2.4.5 Extrato seco total e Umidade

O extrato seco total (EST) foi obtido por meio do aquecimento de 5,0 g da amostra utilizando uma balança analítica com fonte de radiação acoplada à temperatura de 105 °C, até obter peso constante. O teor de umidade é dado pela diferença do peso final e o peso inicial.

4.2.4.6 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla, a partir da pesagem de 2,0 g da amostra em uma cápsula de porcelana, que foi colocada numa mufla preaquecida a 500 °C por, aproximadamente, 5 horas, até as cinzas ficarem brancas.

4.2.5 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados nos laboratórios de Leite e Derivados e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da UFPE.

4.2.5.1 Preparo de meios de cultura e solução de cloridrato de clindamicina

O meio Agar MRS (Merck) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, com reidratação em água destilada, na proporção de 68,20 g por litro de solução. Foram preparados frascos com 400 mL de meio cada, sendo todos esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min, seguido de armazenamento em geladeira a 4 ± 1 °C até posterior utilização. O caldo MRS foi preparado de maneira semelhante, dissolvendo 52,2 g para cada litro de solução. O caldo foi então separado em porções de 9 mL, em tubos de ensaio, e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min, seguido de armazenamento em geladeira a 4 ± 1 °C. A solução salina peptonada foi preparada dissolvendo-se 8,5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 10 g de peptona para cada 1 litro de água destilada. Após homogeneização, a solução foi distribuída em volumes de 225 mL em frascos de vidros, seguido de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min e armazenamento em geladeira a 4 ± 1 °C.

Para o preparo da solução de cloridrato de clindamicina (Sigma-Aldrich), na concentração de 5 ppm, 10 mg do antibiótico foram dissolvidos em 200 mL de água destilada, seguido de esterilização por filtração através de um filtro de membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro (Kasvi K18-230). O conteúdo filtrado foi recebido em dois frascos estéreis de 100 mL e armazenados em geladeira a 4 ± 1 °C.

4.2.5.2 Avaliação do uso de cloridrato de clindamicina para contagem seletiva de *L. acidophilus* LAFTI L10

Um estudo preliminar foi realizado para avaliação do uso do antibiótico cloridrato de clindamicina ($C_{18}H_{33}N_2ClO_5S$) para contagem seletiva do *L. acidophilus* LAFTI L10 em iogurtes, utilizado como agente de inibição das culturas iniciadoras presentes nas amostras.

Foram preparados 2 litros de iogurte integral de leite de cabra adicionado de *L. acidophilus*, Figura 2, e realizada contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) por plaqueamento em Agar Man Rogosa Sharpe (MRS), e em paralelo, realizada contagem no meio MRS adicionado de clindamicina (MRS-CL), conforme metodologia de Van de

Castele (2006). As contagens microbianas dos dois métodos foram comparadas estatisticamente quanto a diferença significativa.

4.2.5.3 Contagem de *Lactobacillus acidophilus* LAFT-L10

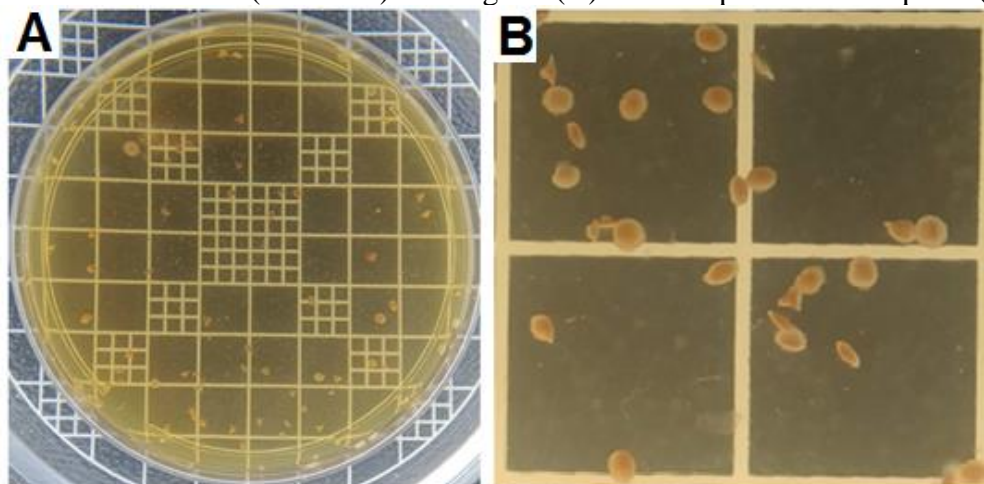
Para o estudo de crescimento e viabilidade de *L. acidophilus* LAFT-L10 em iogurte integral de leite de cabra, foi realizada a contagem seletiva deste probiótico em intervalos de 1h, durante a etapa de fermentação (Etapa I), e também em intervalos de 5 dias, durante um período total de 35 dias de armazenamento das amostras sob refrigeração (Etapa II). Ambas as contagens foram realizadas em triplicatas.

A preparação das amostras foi realizada conforme metodologia descrita em Silva et al. (2007). Pesou-se $25,00 \pm 1,00$ g do iogurte integral de leite de cabra e transferiu-se asepticamente para frascos contendo 225 mL de solução salina peptonada (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição foram feitas as demais diluições decimais em série, transferindo-se 1 mL para os tubos com 9 mL de caldo MRS, até atingir o número de diluições desejável. Para a etapa I foram preparadas diluições até 10^{-10} e para a etapa II foram preparadas diluições até 10^{-7} . Para cada ensaio fez-se uso do mínimo de 3 diluições diferentes, com plaqueamento em triplicata para cada diluição.

A contagem seletiva de *L. acidophilus* LAFT-L10 foi realizada através da técnica de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em meio Agar MRS adicionado de cloridrato de clindamicina (MRS-CL), concentração de 5 ppm, conforme metodologia de Van de Castele (2006) e da Organização Internacional de Padronização (ISSO, 20128 / IDF 192: 2006) (ISO, 2006). Fez-se a adição do antibiótico ao meio MRS no momento imediatamente anterior ao plaqueamento, com a temperatura do meio em $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, na proporção de 1mL da solução para cada 100mL de meio de cultura, obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg/L de clindamicina.

Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições para placas de Petri estéreis, e vertidos aproximadamente 20,0 mL de meio de cultura MRS-CL, seguido de homogeneização. Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas em câmara BOD (Tecnal®), em anaerobiose, a $37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por $72 \pm 1\text{h}$. A enumeração das colônias típicas (brancas cremosas com bordas irregulares) (Figura 3), foi realizada com auxílio de contador de colônias mecânico (*Phoenix Lufasco*®) e a concentração bacteriana foi expressa em logaritmo na base 10 de Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra ($\log \text{UFC/mL}$).

Figura 3 - Colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI-L10 em meio MRS adicionado de clindamicina (MRS-CL): visão geral (A) e visão aproximada da placa (B)



Fonte: O autor.

4.2.6 Modelagem matemática dos dados

Os dados experimentais das contagens de *L. acidophilus*, das etapas de fermentação (I) e armazenamento (II), foram ajustados ao modelo de Baranyi e Roberts (1994), que relaciona a variação de concentração microbiana com o tempo de armazenamento, sob condição isotérmica. Os ajustes dos dados brutos foram realizados com auxílio da ferramenta DMFit, um suplemento do Microsoft Excel, desenvolvido pelo Institute of Food Research (Reino Unido), e que permite o cálculo estimado dos seguintes parâmetros cinéticos: taxa de crescimento máximo (μ , expressa em h^{-1}), tempo da fase lag (λ , expresso em horas), população inicial (y_0 , expressa em log UFC/g) e população máxima (y_{max} , expressa em log UFC/g).

4.2.7 Análise estatística

Os dados físico-químicos e microbiológicos foram avaliados pela ANOVA e comparados pelo teste t e Tukey, ao nível de significância de 5% através o programa Statistic for Windows 7.0. O ajuste do modelo de Baranyi e Roberts foi avaliado através do cálculo dos índices estatísticos RMSE, fator bias e fator exatidão (*accuracy*), comparando os dados experimentais aos valores preditos pelo modelo de regressão não-linear, segundo metodologia de Ross (1996).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização físico-química da amostra

No Brasil não há normas específicas que estabeleçam parâmetros de qualidade para iogurtes derivados de leite caprino. Assim, neste trabalho, utilizou-se como referência a legislação brasileira vigente para iogurtes de leite de vaca, cujos padrões estão estabelecidos na Instrução Normativa n° 46 de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leites Fermentados (BRASIL, 2007).

De acordo com a caracterização físico-química do produto produzido (Tabela 1), este pode ser classificado como um iogurte integral por apresentar um teor de matéria gorda maior que 3,0% (3,07%), além de atender os requisitos para a concentração de proteínas (4,17%) e acidez (0,70 g de ácido láctico por 100g da amostra).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de iogurte integral de leite caprino adicionado de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 comparados com a legislação vigente

Ensaio	Amostra	Legislação (IN 46, 2006)
pH	4,42 ± 0,02	-
Acidez (% de ácido láctico)	0,70 ± 0,12	0,6 - 1,5
Matéria gorda (%)	3,07 ± 0,06	3,00 – 5,99
Proteínas (%)	4,17 ± 0,83	Mín. 2,90
Umidade (%)	80,75 ± 0,08	-
Sólidos não voláteis total (%)	19,25 ± 0,08	-
Resíduo mineral fixo (%)	0,68 ± 0,01	-

Os parâmetros físico-químicos encontrados (Tabela 1), foram semelhantes aos encontrados por Machado et al. (2017), em iogurte de leite de cabra com *L. acidophilus* (sem outros aditivos), cujos valores médios foram de 3,0%, 3,86%, 15,02% e 0,80% para matéria gorda, proteínas, sólidos totais e resíduo mineral, respectivamente.

4.3.2 Avaliação do uso de cloridrato de clindamicina para contagem seletiva de *L. acidophilus* LAFTI L10

Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de bactérias do gênero *Lactobacillus*, em iogurte integral de leite de cabra, obtidas por plaqueamento em meio Man Rugosa Sharpe, sem adição de antibiótico (MRS) e com adição do cloridrato de

clindamicina (MRS-CL) durante os 42 dias de estocagem sob refrigeração.

Tabela 2 - Concentrações de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* em iogurte integral de leite de cabra obtidas em meio MRS sem adição de antibiótico (MRS) e com adição de cloridrato de clindamicina (MRS-CL)

Tempo (dias)	Concentração de <i>Lactobacillus</i> (log UFC/mL)	
	MRS	MRS-CL
0	7,01± 0,04 ^a	6,91 ± 0,04 ^b
7	7,73± 0,04 ^a	7,56 ± 0,01 ^b
14	8,03± 0,10 ^a	7,77 ± 0,01 ^b
21	7,93± 0,02 ^a	7,82 ± 0,03 ^b
28	8,00± 0,04 ^a	7,65 ± 0,08 ^b
35	7,89± 0,04 ^a	7,79 ± 0,02 ^b
42	8,21± 0,01 ^a	8,06 ± 0,04 ^b

a-b Concentração ± desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam diferença entre os diferentes meios, pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

A capacidade do cloridrato de clindamicina de inibir o crescimento das culturas “starters” do iogurte, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, pode justificar a diferença estatística (Tabela 2) ($p < 0,05$) entre as concentrações de *Lactobacillus* obtidas pelos dois métodos empregados, indicando que a adição deste antibiótico ao meio MRS pode ser realizada para contagem seletiva de probióticos *Lactobacillus acidophilus* em amostras de iogurtes (ASHRAF; SHAH, 2011).

Van de Castele et al. (2006) avaliaram diferentes meios de cultura para contagem seletiva de probióticos de lactobacilos e bifidobactérias em combinação com as culturas iniciadoras de queijos e iogurtes, concluindo que a combinação MRS-Clindamicina foi a mais eficiente na contagem seletiva das estirpes de *Lactobacillus acidophilus* La-145 e LAFTI L10. Em outro estudo, Saccaro et al. (2011), utilizando-se da mesma metodologia, comprovaram que o meio MRS contendo antibióticos, incluindo a clindamicina, é eficaz na contagem seletiva de cepas de *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* presentes em leites fermentados.

4.3.3 Cinética de fermentação

Ao analisar os dados de concentração de *L. acidophilus* LAFTI L10, pH e acidez obtidos durante a etapa de fermentação (Tabela 3), percebeu-se uma variação

estatisticamente relevante destes valores ao longo do tempo ($p \leq 0,05$). A contagem do probiótico variou de 4,12 log UFC/mL para 7,05 log UFC/mL em 6,5 horas, o pH reduziu de 6,34 para 4,64 e a acidez aumentou de 0,18 a 0,65 (% de ácido láctico), neste mesmo período.

Tabela 3 - Concentração de *L. acidophilus* LAFTI L10, pH e acidez durante a fermentação do iogurte integral de leite de cabra entre 0 e 6,5 horas a 42 °C

Tempo (horas)	Concentração <i>L. acidophilus</i> (log ₁₀ UFC/mL)	pH	Acidez (% de ácido láctico)
0	4,12 ± 0,02 ^g	6,34 ± 0,08 ^a	0,18 ± 0,00 ^h
1	4,47 ± 0,01 ^f	6,22 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,00 ^h
2	5,07 ± 0,01 ^e	6,10 ± 0,01 ^b	0,21 ± 0,00 ^g
3	5,36 ± 0,02 ^d	5,49 ± 0,03 ^c	0,38 ± 0,00 ^f
4	5,90 ± 0,03 ^c	4,97 ± 0,01 ^d	0,55 ± 0,00 ^e
4,5	5,89 ± 0,03 ^c	4,80 ± 0,00 ^e	0,60 ± 0,00 ^d
5	-	4,78 ± 0,00 ^e	0,64 ± 0,00 ^b
5,5	6,18 ± 0,10 ^b	4,74 ± 0,02 ^{ef}	0,66 ± 0,01 ^a
6	-	4,72 ± 0,01 ^{ef}	0,63 ± 0,00 ^c
6,5	7,05 ± 0,01 ^a	4,64 ± 0,00 ^f	0,65 ± 0,00 ^a

a-g Dado observado ± desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

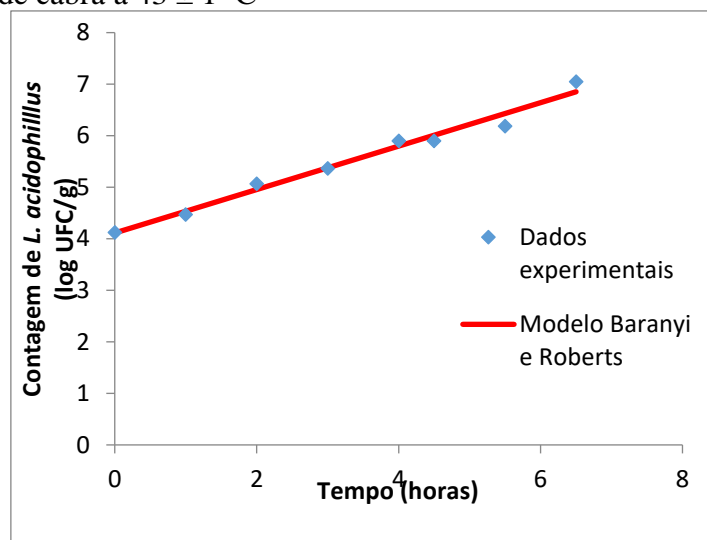
A etapa de fermentação é caracterizada pela intensa atividade metabólica microbiana, na qual as culturas lácticas presentes, principalmente *S. thermophilus*, em condições ótimas de pH e temperatura, utilizam a lactose disponível no leite de cabra para a produção de ácido láctico (fermentação láctica), provocando redução de pH e elevação de acidez do meio, justificando as alterações observadas nesta pesquisa (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DA SILVA et al., 2016). Segundo Gopal (2011), o crescimento da cultura de *L. acidophilus* em iogurte é favorecido por metabólitos como ácido fórmico e, possivelmente, dióxido de carbono e piruvato, ambos produzidos pelas colônias de *S. thermophilus* presentes no meio.

Resultados similares foram encontrados por Shu et al. (2018), em estudo com iogurte de leite caprino com adição de *Lactobacillus acidophilus*, que obtiveram uma fermentação de 3 horas de duração, variando a concentração de *L. acidophilus* de 6,48 log UFC/mL para 7,18 log UFC/mL, com redução de pH de 5,4 para 4,5, neste mesmo intervalo de tempo.

4.3.4 Modelagem de crescimento de *L. acidophilus* LAFTI L10 na etapa de fermentação

Na Figura 4 observa-se o ajuste dos dados de crescimento de *L. acidophilus* LAFTI L10, durante a etapa de fermentação do iogurte, ao modelo primário de Baranyi e Roberts.

Figura 4 - Valores de contagem de *L. acidophilus* por plaqueamento em meio MRS-CL e valores preditos pela curva do modelo Baranyi e Roberts na etapa de fermentação do iogurte de leite de cabra a 43 ± 1 °C



Os parâmetros cinéticos da curva obtida (Tabela 4) fornecem informações sobre o crescimento microbiano durante o tempo de fermentação estudado. No ajuste dos dados não identificou tempo de latência (fase lag). A taxa de crescimento específica (μ) foi de $0,4214 \text{ h}^{-1}$, a população inicial (y_0) foi de $4,1124 \text{ log UFC/g}$ e a população final de fermentação ($y_{\text{máx}}$) foi de $6,8516 \text{ log UFC/g}$.

De acordo com os índices estatísticos calculados (Tabela 4), observa-se que o modelo apresentou um bom ajuste dos dados experimentais, uma vez que o coeficiente de regressão (R^2) foi $0,9742$ e o valor da raiz do erro quadrático médio foi próximo de zero ($\text{RMSE} = 0,0144$). O fator bias (Fb) e fator exatidão (Fe) foram ambos próximos de 1, sendo $1,0037$ e $1,0148$, respectivamente. Segundo Ross (1996), o $\text{Fb} > 1$ indica uma superpredição dos dados, ou seja, o valor previsto está acima do valor observado, enquanto o Fe indica o desvio médio do valor experimental para o valor predito. No caso estudado, o fator exatidão indicou um erro de previsão, aproximadamente, em apenas $1,5\%$ dos casos.

Tabela 4. Dados de parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos para o modelo de

Baranyi e Roberts na etapa de fermentação do iogurte de leite de cabra

Parâmetros cinéticos				Índices estatísticos			
μ	λ	y_0	$y_{\text{máx}}$	RMSE	bias	R ²	Exatidão
0,4214	-	4,1124	6,8516	0,0144	1,0037	0,9742	1,0148

4.3.5 Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 durante o tempo de armazenamento a 4 °C

Também foi realizado o acompanhamento da viabilidade de *L. acidophilus* no iogurte integral de leite caprino, em intervalos de 5 dias, durante os 35 dias de armazenamento, cujos valores da concentração, assim como do pH e acidez, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de *L. acidophilus*, pH e acidez durante o armazenamento do iogurte integral de leite de cabra durante 35 dias a 4 ± 1 °C

Tempo (dias)	Concentração <i>L. acidophilus</i> (log ₁₀ UFC/mL)	pH	Acidez (% de ácido láctico)
0	7,15 ± 0,11 ^a	4,63 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,01 ^b
5	7,15 ± 0,21 ^{ab}	4,40 ± 0,04 ^b	0,70 ± 0,01 ^a
10	7,14 ± 0,04 ^{ab}	4,44 ± 0,01 ^b	0,70 ± 0,01 ^a
15	7,09 ± 0,07 ^{ab}	4,43 ± 0,02 ^b	0,70 ± 0,01 ^a
20	7,04 ± 0,06 ^{abc}	4,45 ± 0,01 ^b	0,70 ± 0,01 ^a
25	6,95 ± 0,07 ^{abc}	4,44 ± 0,02 ^b	0,70 ± 0,01 ^a
30	6,76 ± 0,03 ^{bc}	4,44 ± 0,00 ^b	0,70 ± 0,02 ^a
35	6,65 ± 0,08 ^c	4,42 ± 0,00 ^b	0,71 ± 0,01 ^a

a-c Dado observado ± desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As contagens de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 no iogurte de leite de cabra produzido, em todo o período de armazenamento (Tabela 5), permaneceram em concentrações desejadas (> 6 log UFC/mL) para promoção da saúde e demais benefícios ao consumidor final, atendendo às concentrações recomendadas para alimentos funcionais (PARKER et al., 2018; SANGAMI; SRI, 2017; VINDEROLA et al., 2000).

No estudo da população de *L. acidophilus* LAFTI L10, observou-se uma estabilidade durante os 25 primeiros dias de armazenamento ($P > 0,05$), seguido de

decréscimo a partir do 30º dia ($P \leq 0,05$). A estabilidade inicial da concentração do probiótico pode ser justificada pelas ótimas condições nutricionais e ambientais nos quais estavam inseridos, uma vez que culturas de *Lactobacillus acidophilus* possuem afinidade de crescimento a temperatura de refrigeração (GOPAL, 2011) e também em pH mais baixos, típico de leites fermentados, conforme estudo de Hoque et al. (2010), no qual constataram boas condições de sobrevivência para estes microrganismos em condições extremas de acidez (pH 2,5).

Entretanto, a redução da concentração de *L. acidophilus* nas últimas semanas de armazenamento (Tabela 5) pode ser devido a intensa atividade metabólica das demais culturas presentes no meio, principalmente de *L. bulgaricus*, que resulta na produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que afetam a estabilidade das cepas probióticas (DONKOR et al, 2006; GOPAL, 2011; DA SILVA et al., 2016). Ng, Yeung e Tong (2011), em estudo com diferentes cepas de *L. acidophilus*, observaram que a contagem deste microrganismo diminuiu durante o tempo de estocagem das amostras de iogurte, ao mesmo tempo que a concentração de peróxido de hidrogênio aumentava, evidenciando uma correlação entre esses parâmetros.

Em relação aos valores de pH e acidez (Tabela 5), houve um decréscimo ($p \leq 0,05$) ao longo das semanas, fato já esperado devido à continuidade da atividade fermentativa das bactérias ácido lácticas, mesmo em temperatura de refrigeração, convertendo a lactose em ácido láctico (COGAN; ACCOLAS, 1990; OZOGUL; HAMED, 2016). Um fenômeno indesejável conhecido como “pós-acidificação” é protagonizado pelas bactérias lácticas da espécie *L. bulgaricus*, resultante da sua atividade metabólica, embora a presença desses microrganismos seja importante para dar características sensoriais ao produto final, principalmente devido a formação de compostos aromáticos (OLIVEIRA; DAMIN, 2003; GUYOT, 1992).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os valores encontrados por Machado et al. (2017), que perceberam uma redução de aproximadamente 6% no pH e aumento de 7% da acidez durante 28 dias de validade de iogurte de leite caprino à 4°C, além de observar um declínio de dois ciclos logarítmicos da concentração de *L. acidophilus*, neste mesmo período. Mani-López, Palou e López-Malo (2014) também observaram redução de pH e aumento de acidez em amostras de iogurtes com *L. acidophilus* durante 35 dias de armazenamento a 5 °C.

Alguns autores estudaram alternativas para aumento da viabilidade de *L. acidophilus* em iogurte de leite caprino, como, por exemplo, a adição de mel de abelha

sem ferrão (MACHADO et al., 2017) e a incorporação de prebióticos, a exemplo da estaquiouse (SHU et al., 2018), constatando que o uso desses componentes é favorável ao crescimento da cepa probiótica, elevando o caráter funcional do leite fermentado.

4.3.6 Modelagem da viabilidade de *L. acidophilus* na etapa de armazenamento

Após ajustes dos dados experimentais, obteve-se a curva de predição da concentração de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 (em log UFC/g) em iogurte integral de leite de cabra, refrigerado a 4 ± 1 °C, em função do tempo (em horas), para o modelo primário de Baranyi & Roberts (Figura 5). Os parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos são apresentados na Tabela 6.

Figura 5 - Valores da contagem de *L. acidophilus* por plaqueamento em meio MRS-CL e os valores preditos pela curva do modelo Baranyi e Roberts durante estocagem do iogurte de leite de cabra a 4 ± 1 °C

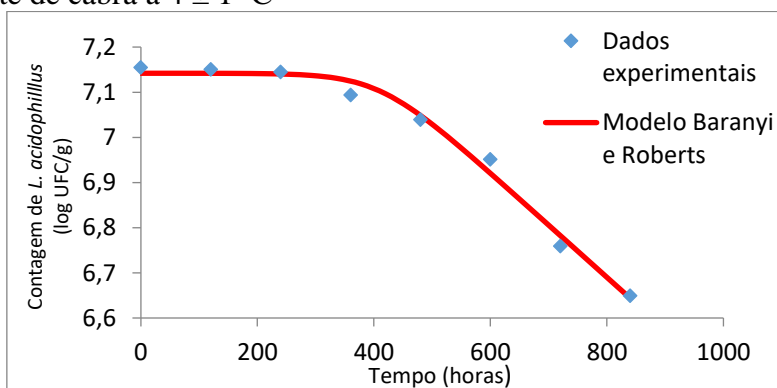


Tabela 6 - Dados de parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos para o modelo de Baranyi e Roberts

Parâmetros cinéticos					Índices estatísticos		
μ	λ	y_0	$Y_{m\acute{a}x}$	RMSE	bias	R^2	Exatidão
-0,0012	409,34	7,1420	-	0,0004	1,0001	0,9848	1,0022

Os parâmetros cinéticos obtidos (Tabela 6) descrevem o comportamento microbiano durante o período estudado. A taxa de crescimento específico (μ) foi de $-0,0012 \text{ h}^{-1}$, indicando que houve um declínio (morte) das células de *L. acidophilus*. O tempo da fase lag (λ) foi de 409,34 horas (aproximadamente 17 dias), período de estabilidade da concentração do microrganismo no produto, característica de adaptação às condições ambientais do alimento.

Com o tratamento dos dados experimentais, foi possível calcular os índices estatísticos, Tabela 6, os quais demonstraram que os valores observados foram bem descritos pelo modelo matemático primário de Baranyi & Roberts. O baixo valor da raiz do erro quadrático médio (RMSE = 0,0004) e o coeficiente de regressão próximo de 1 ($R^2 = 0,9848$) evidenciam probabilidade pequena de erros, e conseqüentemente um bom ajuste dos dados para o modelo estudado. O fator bias levemente maior que 1 ($F_b = 1,0001$) indica que os valores encontrados experimentalmente são menores que os preditos pelo modelo. O fator exatidão foi ligeiramente maior que 1 ($F_e = 1,0022$), indicando um erro de previsão menor que 1%, o que reforça ainda mais a eficiência do modelo quanto a predição do comportamento das células de *L. acidophilus* nas amostras analisadas LAFTI L10.

Apesar do vasto conhecimento da microbiologia preditiva, ainda há uma escassez de pesquisas sobre viabilidade de cepas probióticas através da modelagem matemática, sobretudo em alimentos de origem caprina. Nikmaram et al. (2016) fizeram um estudo preditivo da viabilidade de *L. acidophilus* La-5, durante 21 dias de armazenamento a 4 °C, em amostras de iogurte de romã, no qual observaram bom ajuste de dados experimentais ao modelo de Monte Carlo, com $R^2 = 0,96$, concluindo que esta é uma importante ferramenta para estimar a concentração de probióticos durante estocagem do produto final.

Com os dados dos parâmetros cinéticos, Tabela 6, foi possível obter a função matemática, Equações 1 e 2, derivadas do modelo Baranyi e Roberts, que prediz a concentração da cultura de *L. acidophilus* em função do tempo nas condições estudadas de armazenamento das amostras de iogurte integral de leite de cabra.

$$y(t) = y_0 + -0,0012A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{-0,0012A(t)} - 1}{e^{0,00157}}\right) \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{-0,0012} \ln(e^{0,0012t} + e^{0,491208} - e^{0,0012(t+409,34)}) \quad (2)$$

Onde y é a contagem de *L. acidophilus* (em log UFC/g) no tempo t (em horas).

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciam os bons ajustes do comportamento do *L. acidophilus* LAFTI L10 no iogurte de leite caprino ao modelo de Baranyi e Roberts, com índices estatísticos que demonstraram melhor eficiência de predição desse modelo na etapa de armazenamento do produto, o que possibilita a

predição do crescimento do probiótico em produções futuras.

CONCLUSÃO

As amostras de iogurte integral de leite de cabra apresentaram parâmetros físico-químicos adequados com os valores da legislação brasileira e este alimento demonstrou ser uma matriz alimentar favorável ao crescimento e viabilidade da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10. A modelagem matemática forneceu os valores de parâmetros cinéticos, que permitiram uma melhor compreensão do comportamento das células probióticas durante as etapas de fermentação e estocagem das amostras. Os índices estatísticos calculados demonstraram que o modelo primário de Baranyi e Roberts pode ser utilizado para prever o crescimento/morte da cultura de *L. acidophilus* nas condições estudadas, com elevada confiabilidade. Este resultado apresenta grande potencial para as indústrias de laticínio, uma vez que, aplicando a modelagem preditiva, podem obter uma melhor otimização do processo e conhecimento sobre a viabilidade probiótica dos seus produtos.

REFERÊNCIAS

- ARENA, M. P., CAGGIANIELLO, G., RUSSO, P., ALBENZIO, M., MASSA, S., FIOCCO, D., SPANO, G. (2015). Functional starters for functional yogurt. **Foods**, v. 4, p. 15–33, 2015.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and Bifidobacterium spp. in yoghurt - **A review. International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 194–208, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2006.
- COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. The Microbiology of Milk. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, 1990. 301p., v. 1. p.77-114.
- COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; FRANCO, R. M.; MÁRSICO, E. T.; CRUZ, A. G.; JUNIOR, C. A. C. Changes in expected taste perception of probiotic and conventional yogurts made from goat milk after rapidly repeated exposure. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 2610–2618, 2014.
- DA SILVA, F. C. G.; DALAQUA, S.; DE AZEVEDO, E. C.; DE CAMPOS, G. M., RAGHIANTE, F.; MARTINS, O. A. Perfil do ácido láctico no prazo de validade de iogurte natural integral Profile of lactic acid within validity of full natural yogurt. **Revista**

Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 10, p. 595–603, 2016.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. *Química dos Alimentos*. 4ª ed. Porto alegre. Rio Grande do Sul. 899 pp. 2010.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **Internacional Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DUARTE, M.C.K.H.; CORTEZ, N.M.S.; CORTEZ, M.A.S.; FRANCO, R.M.; MACEDO, N.C. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

EMBRAPA. Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro – **Anuário Leite 2018**, EMBRAPA, 201, 114p. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>. Acesso em 15 de jul. 2019.

FAZILAH, N, F.; ARBAKARIYA, B. A.; MOHD, E. K.; LEONARDO, R.; MURNI, H. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicalson the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v.48, p.387–399, 2018.

GOPAL, P. K. Lactic acid bacterial| *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. In: *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier, 2 ed, p. 91-95, 2011.

GUYOT, A. Les yoghourts. **Le Lait et Nous**, n. 2, p. 6-12, 1992.

HOQUE, M. Z.; AKTER, F.; HOSSAIN, K. M.; RAHMAN, M. S. M.; BILLAH, M. M.; ISLAM, K. M. D. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp. From Selective Regional Yoghurts. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 5, p. 39-46, 2010.

ISO. **Milk products – Enumeration of Presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a Selective Medium – Colony-count Technique at 37 Degrees C. ISO 20128/IDF 192:2006**. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2006.

MACHADO, T. A. D. G.; OLIVEIRA, M. E. G. D.; CAMPOS, M. I. F.; ASSIS, P. O. A. D.; SOUZA, E. L. D.; MADRUGA, M. S. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017.

MANI-LÓPEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2578-2590, 2014.

MEDVEĐOVÁ, A.; MANČUŠKOVÁ, T.; VALÍK, L.; Growth of *Lactobacillus acidophilus* NCFM in dependence on temperature, **Acta Alimentaria**, v. 45, p. 104-111, 2016.

Ng, E. W.; YEUNG, M.; TONG, P. S.; Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 169-175, 2011.

NIKMARAM, P.; MOUSAVI, S. M.; KIANI, H.; EMAMDJOMEH, Z.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, Z. Modeling the effect of inulin, pH and storage time on the viability of selected lactobacillus in a probiotic fruity yogurt drink using the Monte Carlo simulation, **Journal of Food Quality**, v. 39, p. 362–369, 2016.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p.172-176, 2003.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and gastrointestinal conditions. An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition Journal**, v. 45, p. 125–134, 2018.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501-508, 1996.

SACCARO, D. M.; HIROTA, C. Y.; TAMIME, A. Y.; DE OLIVEIRA, M. N. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 3901-3906, 2011.

SANGAMI, R.; SRI, S. R. Emerging trends in improving viability, advanced stability techniques and health claims of healthy microbiome—The probiotics. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 194–200, 2017.

SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C. C.; KALAVATHY, R.; LIANG, J. B.; ALITHEEN, N. B.; JAHROMI, M. F.; HO, Y. W. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

SHU, G.; TIAN, M.; CAO, B.; WANG, C.; XIN, N. Effects of stachyose on synbiotic yogurt obtained from goat milk with 44 *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY*, v. 22, p. 43-50, 2018.

SILVA, F. A.; ELIEIDY, G. O.; FIGUEIRÊDO, M. F.; SAMPAIO, K. B.; SOUZA, E. L.; DE OLIVEIRA, C. E. V.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA, R. C. R. E. 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, 2017a.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS, R. F. S., GOMES, R. A. R., OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. cap. 14, p.183-189.

SIQUEIRA, A. A.; CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. Microfit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. **Brazilian journal of food technology**. v. 17, n. 4, p. 329-339, 2014.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. S; GOMES, G. A. **Mathematical modeling of microbial growth in milk**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 31, n. 4, p. 891-896, 2011.

VAN DE CASTEELE, S.; VANHEUVERZWIJN. T; RUYSSSEN, T.; VAN ASSCHE, P.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1470-1476, 2006.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

VAN IMPE, J. F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Developing next generation predictive models: a systems biology approach. In: TAOUKIS, et al. **11th International Congress on Engineering and Food**, Atenas, Grécia. p. 465-466, 2011.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean fresco cheese. **Journal Dairy Science**, v.83, p. 1905-1911, 2000.

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS NA PREDIÇÃO DA AÇÃO ANTAGONISTA DE *Lactobacillus acidophilus* FRENTE À ESTIRPES PATOGÊNICAS EM IOGURTE DE LEITE DE CABRA

RESUMO

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) alertam para o elevado número de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Bactérias patogênicas são as principais causadoras dessas enfermidades, tornando-se uma preocupação internacional de saúde pública. A incorporação de probióticos aos leites fermentados é benéfico à saúde do consumidor, uma vez que há evidências sobre ação antagonista desses microrganismos diante de culturas patogênicas. Modelos matemáticos podem ser utilizados na predição de inativação dessas bactérias em alimentos. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes modelos matemáticos quanto a predição da ação antagonista do probiótico *Lactobacillus acidophilus* frente as cepas *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Salmonella typhimurium* (CCCD-S004) e *Escherichia coli* (CCCD-E009), inoculados em iogurte de leite caprino. As amostras de iogurte com e sem probióticos foram contaminadas com patógenos na concentração inicial de 1,0 da escala McFarland, separadamente, e armazenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Realizou-se a contagem das diferentes bactérias a cada 24h e os dados foram ajustados aos modelos de Baranyi e Roberts, Weibull e Bifásico, através dos softwares DMfit 3.5 e GInaFit 1.7. A avaliação estatística foi realizada por meio dos parâmetros estatísticos (R^2 , RMSE, fator bias e fator exatidão) e análise de variância (ANOVA), com uso do Statistic for Windows 7.0. Foi constatada uma maior redução de patógenos nas amostras com adição do probiótico, observando uma maior atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, com redução $> 5,5$ ciclos logarítmicos em 5 dias, e menor eficiência diante de *E. coli*, que permaneceu com contagem acima de 4 log UFC/mL nas duas formulações do iogurte, após 42 dias de armazenamento. O ajuste dos dados para os modelos primários apontou o modelo de Baranyi e Roberts mais adequado para descrever a inibição das cepas de *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*, com RMSE de 0,16, 0,14 e 0,19, respectivamente. O modelo Bifásico explicou melhor o comportamento da estirpe de *S. aureus*, com RMSE de 0,18 e R^2 igual a 0,98. A adição de *L. acidophilus* mostrou ser uma alternativa eficaz para a produção de iogurte de leite caprino mais seguro e a modelagem pode ser uma aliada da indústria quanto a otimização de processos e gerenciamento de riscos.

Palavras-chave: modelagem, patógenos, probióticos

ABSTRACT

Data from the World Health Organization (WHO) has been warning of the high number of foodborne diseases. Contamination by pathogenic bacteria such as salmonella spp. are the main causes of this sort of diseases, leading to death, which is becoming an international public health issue. The incorporation of probiotics into fermented milks is beneficial to the consumer's health, since there is evidence about the antagonistic action of these microorganisms in the presence of pathogenic cultures. Mathematical models can be used to predict the inactivation of these bacteria in food. This research aimed to evaluate different mathematical models regarding the prediction of the antagonistic action of this probiotic against the strains *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Salmonella typhimurium* (CCCD-S004) and *Escherichia coli* (CCCD-E009).), inoculated with goat yogurt. Yogurt samples with and without probiotics were contaminated with pathogens at the initial McFarland 1.0 concentration separately and stored at 4 ± 1 ° C. Different bacteria were counted every 24h and the data were adjusted to Baranyi and Roberts, Weibull and Biphasic models, using DMfit 3.5 and GInaFit 1.7 software. Statistical evaluation was performed using statistical parameters (R², RMSE, bias factor and accuracy factor) and analysis of variance (ANOVA), using Statistic for Windows 7.0. A greater reduction of pathogens occurred in the samples with the addition of the probiotic, observing a greater antimicrobial activity against *P. aeruginosa*, with reduction > 5.5 logarithmic cycles in 5 days, and less efficiency against *E. coli*, which remained with a count above 4 log UFC / mL in the two yogurt formulations, after 42 days of storage. The adjustment of the data for the primary models pointed out the Baranyi and Roberts model most appropriate to describe the inhibition of the strains of *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* and *E. coli*, with RMSE of 0.16, 0.14 and 0.19 , respectively. The Biphasic model better explained the behavior of the *S. aureus* strain, with RMSE of 0.18 and R² equal to 0.98. The addition of *L. acidophilus* proved to be an effective alternative for the production of goat's milk yogurt safer and modeling can be an industry ally in terms of process optimization and risk management.

Keywords: modeling, pathogens, probiotic

4.5 INTRODUÇÃO

É crescente a procura por alimentos mais saudáveis e funcionais ao redor do mundo. Alguns fatores como a inovação tecnológica, aparecimento de novos produtos e maior conscientização dos consumidores têm contribuído para o aumento desta demanda. Os derivados lácteos aparecem como líderes no mercado de produtos funcionais, uma vez que são matrizes alimentares favoráveis à adição e crescimento de microrganismos probióticos. (KUMAR et al., 2015; WENDLING; WESCHENFELDER, 2013; RANADHEERA et al., 2019).

Devido a propriedade hipoalergênica e maior facilidade de digestão, o leite de cabra e seus derivados são alternativas de alimentos saudáveis e nutritivos, ocupando hoje 2% da produção mundial da indústria de laticínio. O iogurte de leite caprino é uma importante fonte de nutrientes, principalmente de proteínas e cálcio (FAZILAH et al, 2018; RANADHEERA, NAUMOVSKI, AJLOUNI, 2018). Apesar de ser considerado um alimento seguro, uma vez que o pH reduzido é um fator de inibição natural de muitos patógenos, o iogurte pode apresentar presença de culturas patogênicas sobreviventes da etapa de fermentação e/ou armazenamento do produto (CUTRIM et al., 2016; SAVRAN; PÉREZ-RODRÍGUEZ; HALKMAN, 2017).

A espécie *Lactobacillus acidophilus* é uma das mais utilizadas em alimentos e destaca-se por sobreviver a meios mais ácidos que outros microrganismos probióticos, além de ter a propriedade de produção de metabólitos antimicrobianos, grande aliado ao tratamento e prevenção de infecção por patógenos (DUARTE et al., 2016; SILVA et al., 2017; SHOKRYAZDAN et al., 2014). Muitos estudos já demonstraram a eficiência antimicrobiana deste probiótico *in vitro*, entretanto ainda há a necessidade de mais pesquisas em matrizes alimentares, avaliando a possível interação desses metabólitos com os componentes dos alimentos (PEREIRA; GOMÉZ, 2007).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, demonstram que entre os anos de 2007 e 2017 foram notificados 12.503 surtos de DTA no Brasil, sendo 236.403 pessoas doentes e uma taxa de mortalidade de 0,08%. Em relação aos agentes etiológicos, 92,2% dos surtos confirmados foram provocados por bactérias, com maior prevalência de *Salmonella*, *Escherichia coli*, e *S. aureus*, respectivamente. Os produtos lácteos estão entre os alimentos mais envolvidos nesses surtos no mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 3% dos casos brasileiros (ARTURSSON et al., 2018; BRASIL, 2018; SILVA et al., 2018).

É crescente a preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos,

sobretudo do leite e seus derivados. Doenças alimentares continuam sendo uma grave questão de saúde pública, levando a óbito milhares de pessoas anualmente, principalmente crianças, idosos e pessoas imunodeficientes. Neste contexto, métodos de predição de crescimento microbiano através de modelos matemáticos estão sendo estudados (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015; LUND, 2015).

Conhecer o comportamento dos microrganismos presentes nos alimentos, em determinadas condições ambientais, é importante para atestar a qualidade microbiológica desses produtos e avaliar riscos de contaminação (ARROYO-LÓPEZ et al., 2014). A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia de alimentos que objetiva prever o comportamento microbiano (multiplicação, inativação e interações) nos alimentos através de modelos e equações matemáticas (ALVARENGA et al., 2018; LONGHI et al., 2013). Com a modelagem pode-se determinar o tempo de validade de alimentos, assim como conhecer as melhores condições de processamento, de otimização e de armazenamento (TELEKEN et al., 2011).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes modelos matemáticos quanto a predição da ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 frente a estirpes de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, inoculadas em amostras de iogurte integral de leite de cabra produzido em laboratório, durante o período de armazenamento do produto refrigerado.

4.6 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia Industrial, ambos pertencentes ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco.

4.6.1 Preparação das amostras de iogurte

O iogurte integral de leite de cabra foi produzido a partir de leite reconstituído (Cappry's) e adições de açúcar (8% m/v) e culturas iniciadoras de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Globalfood) (1% v/v). Duas formulações diferentes foram produzidas, sendo 3 litros de iogurte sem adição de cultura probiótica (I0) e 3 litros com inoculação de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 (1% v/v) (II). Ambas as culturas lácticas foram previamente ativadas em leite desnatado reconstituído e distribuídas em tubos Falcon em concentração de 10^{12} UFC/mL. As

misturas foram colocadas em estufa bacteriológica (Fanem®) a 43 ± 1 °C em frascos de vidro de 500 mL, com acompanhamento da fermentação através de ensaios de pH e acidez a cada 60 min, até atingir valor de pH de 4,6. As amostras foram então armazenadas em geladeira e mantidas refrigeradas a temperatura de 4 ± 1 °C.

4.6.2 Preparo do kit de McFarland

Foram preparados tubos com turbidez equivalente a escala McFarland (escala de 0,5 a 4), para inferência de concentração microbiana, conforme metodologia de Scott (2011). Foram utilizadas soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 0,18 mol/L, e de cloreto de bário ($BaCl_2$), 0,048 mol/L. Para validação da escala, fez-se leitura de absorbância dos tubos, a 600nm, em espectrofotômetro de bancada (Quimis®).

4.6.3 Cepas patogênicas

Os microrganismos patogênicos utilizados neste estudo foram da Coleção de Culturas da Cefar Diagnóstica (CCCD) (São Paulo, Brasil), distribuídos em frascos-ampola com 1 mL de liofilizados em suspensão, Figura 1, ambos com certificados de garantia de qualidade. As cepas utilizadas foram: *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004), *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* (CCCD-S009), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* (CCCD-S004) e *Escherichia coli* (CCCD-E009). Todas as cepas microbianas foram adquiridas na forma liofilizada, o que proporciona ao usuário maior garantia de estabilidade, facilidade no transporte, na utilização, no armazenamento e na vida útil do microrganismo (CEFAR, 2014).

Figura 1 – Cepas patogênicas liofilizadas da Coleção de Culturas da Cefar Diagnóstica



Fonte: O autor

4.6.3.1 Ativação das cepas patogênicas

As cepas patogênicas foram inicialmente hidratadas em 200µL de água destilada

esterilizada, com o auxílio de uma seringa estéril de 1mL. Após alguns minutos, o conteúdo do frasco-ampola foi transferido para tubos de ensaio estéreis, com volumes de 10 mL de Caldo Nutriente (CN) e homogeneizados. Os tubos foram então levados para ativação em estufa bacteriológica a 35 °C, permanecendo nesta condição por 24 horas. Após ativação, parte do material biológico foi transferido para outros tubos com Caldo Nutriente, com auxílio de uma alça de Platina, até atingir turbidez referente ao padrão 1,0 da escala McFarland, equivalente a concentração microbiana de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para auxiliar na visualização da turbidez fez-se uso de um Cartão de Wickerham.

4.6.3.2 Inoculação das culturas patogênicas

Amostras das duas formulações de iogurte produzidas, com inoculação de *Lactobacillus acidophilus* (I1) e sem inoculação de *Lactobacillus acidophilus* (I0), foram contaminadas com as cepas patogênicas. Foram inoculados 2,5mL da suspensão microbiana patogênica ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), previamente preparada, em três amostras de 500mL de cada formulação. O procedimento foi repetido para cada patógeno, separadamente. As amostras contaminadas foram armazenadas em geladeiras sob refrigeração de 4 ± 1 °C.

4.6.4 Contagem de patógenos nas amostras contaminadas

As contagens de patógenos nas amostras contaminadas (I0 e I1) foram realizadas a cada 24h, por plaqueamento, em triplicatas, até que o número de colônias atingisse o limite mínimo de detecção do método. Foram selecionadas placas com 20 a 200 colônias típicas de cada microrganismo, contadas com auxílio de um contador de colônias mecânico (Phoenix Luferto®), sendo a contagem expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e posteriormente convertida em log UFC/mL.

A partir de 1 g das amostras I0 e I1, contaminadas com cada um dos patógenos, separadamente, foram preparadas diluições decimais seriadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada (SSP), até a diluição 10^{-4} . As diluições foram realizadas com uso de pipetadores dispensadores automáticos e auxílio de um agitador de tubos tipo vortex (Fisatom®) para homogeneização dos tubos.

4.6.4.1 Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004

A contagem de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada em placas contendo 30 mL de Agar cetrimide (Merck, Alemanha) através da técnica de espalhamento em superfície.

Alíquotas de 100 µL das amostras diluídas foram transferidas para as placas e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski estéril, até completa absorção pelo meio. A incubação das placas foi realizada em estufa bacteriológica (Fanem®) a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h. Fez-se a contagem de colônias típicas, com pigmentação azul esverdeada e fluorescentes sob a luz ultravioleta de 254 nm, conforme ilustrado na Figura 2 (a).

4.6.4.2 Contagem de *Staphylococcus aureus* CCCD-S009

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi realizada em placas contendo meio Agar Baird Parker (Kasvi) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio (K_2TeO_3). O meio foi preparado dissolvendo-se 15g de Agar Baird Parker para cada porção de 250 mL de água destilada, seguido de esterilização a 121 °C por 15 min em autoclave. Após resfriamento, em 60 ± 1 °C, foram adicionados 25 mL de solução gema-água esterilizada (proporção 1:1) e 2,5 mL de solução de telurito de potássio (1% m/v). Após homogeneização, aproximadamente 20 mL do meio foram vertidos em placas de Petri estéreis, e aguardou-se a total solidificação.

Alíquotas de 100 µL das amostras diluídas foram transferidas para as placas e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski, até completa absorção pelo meio. A incubação das placas foi realizada em estufa bacteriológica (Fanem®) a 37 ± 1 °C por 48 ± 1 h. Fez-se a contagem das colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, circulares pretas com bordas esbranquiçadas e halo transparente, conforme ilustrado na Figura 2 (b).

4.6.4.3 Contagem de *Salmonella typhimurium* CCCD-S004

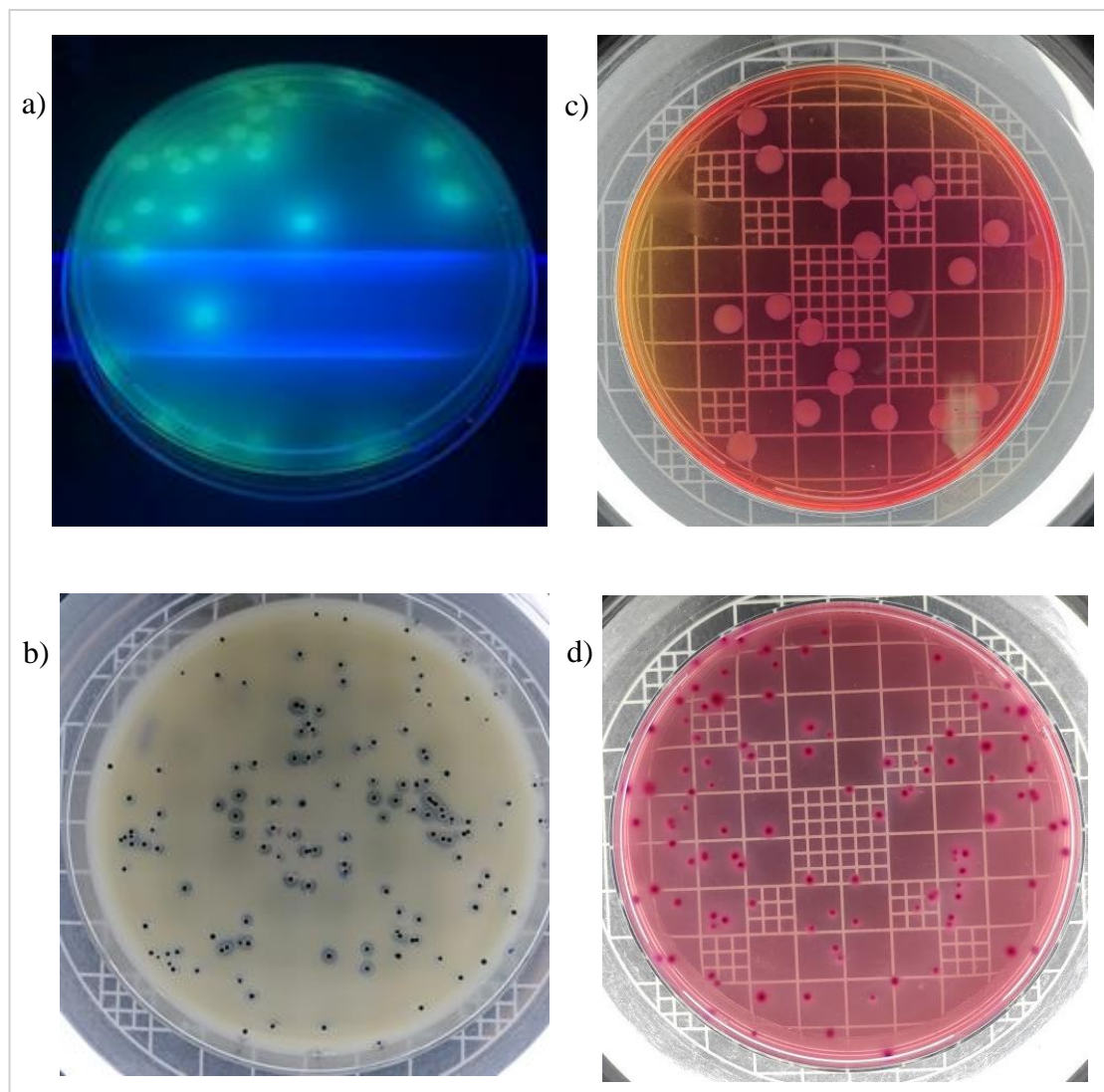
A contagem de *Salmonella typhimurium* nas amostras de iogurte foi realizada através do plaqueamento em superfície em Ágar Verde Brilhante (Oxoid). A incubação das placas foi realizada em estufa bacteriológica (Fanem®) a 36 ± 1 °C por 24 ± 1 h, conforme metodologia de Robazza et al. (2016). Realizou-se a contagem de colônias típicas de *Salmonella typhimurium* (circulares branca-rosadas), conforme ilustrado na Figura 2 (c).

4.6.4.4 Contagem de *Escherichia coli* CCCD-E009

A contagem de *Escherichia coli* nas amostras de iogurte foi realizada através do plaqueamento em profundidade, com sobrecamada, em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) (Difco) e incubação em estufa bacteriológica a 32 ± 2 °C por 24 ± 1 h. Foram enumeradas colônias típicas, circulares de cores rosas a vermelhas com precipitado

de bile, conforme ilustrado na Figura 2 (d).

Figura 2 - Colônias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* em placas de Agar Cetrímide (a), colônias típicas de *Staphylococcus aureus* em placas de Agar Baird Parker (b), colônias típicas de *Salmonella typhimurium* em placas de Ágar Ágar Verde Brilhante (c) e colônias típicas de *Escherichia coli* em placas de Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (d)



Fonte: O autor.

4.6.5 Testes bioquímicos

As colônias típicas de cada patógeno foram selecionadas para realização de alguns testes bioquímicos complementares para confirmação dos microrganismos. Para cada cepa realizou-se o teste de catalase, teste de oxidase e coloração de Gram, de acordo com o Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal (Brasil, 2018).

4.6.6 Contagem de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L-10

Foi realizada a contagem seletiva de *L. acidophilus* nas amostras de iogurte que receberam a inoculação da cepa probiótica e contaminadas com os diferentes patógenos (I1). A contagem foi realizada a cada 7 dias, num período total de 42 dias, através da técnica de plaqueamento *puor-plate* em meio Agar Man Rogosa & Sharpe adicionado de cloridrato de clindamicina (MRS-CL), concentração de 5ppm, conforme metodologia de Van de Castele (2006) e da Organização Internacional de Padronização (ISO, 20128 / IDF 192: 2006) (ISO, 2006). Fez-se a adição do antibiótico ao meio MRS no momento imediatamente anterior ao plaqueamento, com a temperatura do meio em 42 ± 1 °C, na proporção de 1 mL da solução para cada 100mL de meio de cultura, obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg/L de clindamicina.

Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições para placas de Petri estéreis, e vertidos aproximadamente 20,0 mL de meio de cultura MRS-CL. Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas em câmara BOD (Tecnal®), em anaerobiose, a 37 ± 1 °C por 72 ± 1 h. A enumeração das colônias típicas (brancas cremosas com bordas irregulares), foi realizada com auxílio de contador de colônias mecânico (Phoenix Luferco®) e a concentração bacteriana foi expressa em logaritmo na base 10 de Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra (log UFC/g) (BRASIL, 2003).

4.6.7 Ensaio físico-químico

Fez-se o acompanhamento de pH e acidez das amostras contaminadas, I0 e I1, com cada um dos patógenos, separadamente. Os ensaios foram realizados em intervalos de 7 dias, num período total de 42 dias, e seguiram os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal sugeridos pela Instrução Normativa nº68/2006 (BRASIL, 2006).

4.6.8 Modelagem matemática dos dados

Os dados experimentais das contagens das quatro cepas patogênicas, das amostras inoculadas com *L. acidophilus* (I1), foram avaliados para diferentes modelos matemáticos primários, Baranyi e Roberts, Weibull e Bifásico, que relacionam a variação de concentração microbiana com o tempo de armazenamento, sob condição isotérmica.

Os ajustes dos dados brutos foram realizados com auxílio dos *softwares* DMFit (versão 3.5), um suplemento do *Microsoft Excel* desenvolvido pelo Institute of Food Research (Reino Unido), para o modelo Baranyi e Roberts, e GInaFit (versão 1.7),

propriedade da Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica), para os modelos de Weibull e Bifásico. Os parâmetros cinéticos de inativação microbiana para diferentes modelos e microrganismos foram obtidos e avaliados.

4.6.9 Análise estatística

Os dados físico-químicos e microbiológicos foram avaliados pela ANOVA e comparados pelo teste t e Tukey, ao nível de significância de 5% através o programa Statistic for Windows 7.0. O desempenho e comparação dos diferentes modelos matemáticos foram avaliados através do cálculo dos índices estatísticos de coeficiente de regressão (R^2), erro quadrático médio (RMSE), fator bias e fator exatidão (*accuracy*), segundo metodologia de Ross (1996).

4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.7.1 Caracterização das cepas patogênicas e das amostras contaminadas

Os testes bioquímicos realizados para as cepas patogênicas apresentaram resultados de acordo com as características esperadas para cada estirpe. A coloração de Gram foi negativa para *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*, e positiva para *S. aureus* (Apêndice 1). O teste de catalase indicou positivo para todas as espécies analisadas, enquanto o teste de oxidase foi positivo para *P. aeruginosa* e negativo para as demais cepas analisadas.

Os resultados do acompanhamento físico-químico (pH e acidez) durante os 42 dias de armazenamento das amostras contaminadas, sem adição e com adição do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Todas as formulações de iogurte produzidas nesta pesquisa apresentaram acidez em acordo com a legislação vigente para leites fermentados (IN 46 de 2007), que preconiza valores na faixa de 0,6 – 1,5 acidez g de ácido láctico por 100g da amostra (BRASIL, 2007).

Tabela 1 – Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

Tempo (dias)	pH		Acidez (% de ácido láctico)	
	Amostra I0	Amostra I1	Amostra I0	Amostra I1
0	4,59 ± 0,05 ^a	4,44 ± 0,03 ^a	0,57 ± 0,01 ^c	0,67 ± 0,02 ^c
7	4,37 ± 0,01 ^b	4,18 ± 0,00 ^{bc}	0,64 ± 0,01 ^b	0,72 ± 0,01 ^b
14	4,38 ± 0,01 ^b	4,16 ± 0,01 ^c	0,66 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,01 ^a
21	4,41 ± 0,01 ^b	4,19 ± 0,01 ^{bc}	0,67 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,01 ^{ab}
28	4,37 ± 0,06 ^b	4,20 ± 0,01 ^b	0,66 ± 0,01 ^a	0,76 ± 0,01 ^a
35	4,42 ± 0,07 ^b	4,19 ± 0,01 ^{bc}	0,67 ± 0,01 ^a	0,76 ± 0,01 ^a
42	4,38 ± 0,02 ^b	4,19 ± 0,01 ^{bc}	0,67 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,01 ^a

a-c Dado observado ± desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com *Staphylococcus aureus* sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

Tempo (dias)	pH		Acidez (% de ácido láctico)	
	Amostra I0	Amostra I1	Amostra I0	Amostra I1
0	4,68 ± 0,01 ^a	4,61 ± 0,01 ^a	0,60 ± 0,01 ^b	0,62 ± 0,00 ^d
7	4,45 ± 0,01 ^b	4,25 ± 0,01 ^b	0,65 ± 0,00 ^a	0,76 ± 0,01 ^c
14	4,52 ± 0,02 ^b	4,20 ± 0,04 ^{bc}	0,64 ± 0,01 ^a	0,79 ± 0,01 ^b
21	4,52 ± 0,01 ^b	4,23 ± 0,01 ^b	0,67 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,01 ^a
28	4,50 ± 0,02 ^b	4,20 ± 0,01 ^{bc}	0,66 ± 0,02 ^a	0,82 ± 0,01 ^a
35	4,50 ± 0,01 ^b	4,19 ± 0,01 ^{bc}	0,66 ± 0,02 ^a	0,82 ± 0,00 ^a
42	4,51 ± 0,02 ^b	4,13 ± 0,02 ^c	0,67 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,01 ^a

a-d Dado observado ± desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com *Salmonella typhimurium* sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

Tempo (dias)	pH		Acidez (% de ácido láctico)	
	Amostra I0	Amostra I1	Amostra I0	Amostra I1
0	4,61 ± 0,01 ^a	4,56 ± 0,01 ^a	0,60 ± 0,01 ^b	0,62 ± 0,02 ^b
7	4,54 ± 0,01 ^b	4,34 ± 0,01 ^b	0,64 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^a
14	4,50 ± 0,02 ^{bc}	4,30 ± 0,01 ^c	0,64 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a
21	4,50 ± 0,02 ^{bc}	4,32 ± 0,01 ^{bc}	0,64 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a
28	4,46 ± 0,05 ^c	4,29 ± 0,02 ^c	0,65 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a
35	4,53 ± 0,02 ^b	4,31 ± 0,01 ^c	0,64 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^a
42	4,56 ± 0,02 ^b	4,31 ± 0,01 ^{bc}	0,65 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a

a-c Dado observado \pm desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Valores de pH e acidez das amostras de iogurte de leite de cabra contaminadas com *Escherichia coli* sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

Tempo (dias)	pH		Acidez (% de ácido láctico)	
	Amostra I0	Amostra I1	Amostra I0	Amostra I1
0	4,60 \pm 0,01 ^a	4,57 \pm 0,01 ^a	0,64 \pm 0,01 ^c	0,66 \pm 0,01 ^c
7	4,49 \pm 0,01 ^{bc}	4,31 \pm 0,01 ^d	0,65 \pm 0,01 ^c	0,74 \pm 0,00 ^b
14	4,47 \pm 0,01 ^c	4,32 \pm 0,01 ^{cd}	0,66 \pm 0,01 ^{abc}	0,74 \pm 0,01 ^b
21	4,49 \pm 0,01 ^{bc}	4,33 \pm 0,01 ^{bc}	0,67 \pm 0,01 ^{ab}	0,74 \pm 0,01 ^b
28	4,49 \pm 0,01 ^{bc}	4,33 \pm 0,01 ^{bc}	0,66 \pm 0,02 ^{abc}	0,76 \pm 0,01 ^{ab}
35	4,51 \pm 0,01 ^b	4,34 \pm 0,01 ^b	0,66 \pm 0,01 ^{bc}	0,76 \pm 0,01 ^a
42	4,50 \pm 0,01 ^b	4,34 \pm 0,01 ^{bc}	0,69 \pm 0,01 ^a	0,77 \pm 0,01 ^a

a-d Dado observado \pm desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

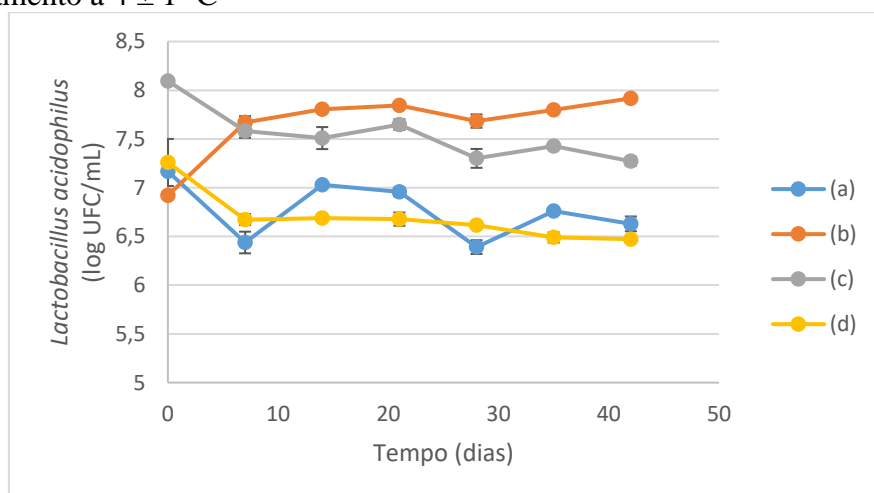
Conforme observado nas Tabelas de 1, 2, 3 e 4, houve uma tendência de redução de pH e elevação de acidez com relação ao tempo ($p \leq 0,05$), em todas as amostras de iogurte de leite de cabra contaminados. Esses resultados podem ser explicados devido à continuidade da atividade fermentativa das bactérias ácido lácticas durante o período de armazenamento, mesmo em temperatura de refrigeração, convertendo a lactose em ácido láctico (COGAN; ACCOLAS, 1990; OZOGUL; HAMED, 2016).

As amostras com adição de *L. acidophilus* (I1) apresentaram valores de pH menores que as amostras sem o probiótico (I0) em todas as medições, em intervalos de 7 dias, durante os 42 dias de acompanhamento. Em relação a acidez, a tendência foi contrária, com as amostras I1 apresentando valores maiores que seus correspondentes valores das amostras I0, no mesmo período. De acordo Calderon et al. (2007), bactérias probióticas possuem a propriedade de produção de ácidos orgânicos, como os ácidos acético e láctico, o que justifica a maior acidez do iogurte com *L. acidophilus* e, conseqüentemente, menor pH do mesmo.

No estudo com iogurte de leite de cabra contaminado com estirpes de *Staphylococcus aureus*, Bednarko-Młynarczyk et al. (2015) encontraram valores de pH entre 4,13 e 4,30 em amostras armazenadas a 4 °C. Cutrim et al. (2016) registraram valores de pH entre 4,47 e 4,51 em iogurtes tradicionais contaminados com *Escherichia coli*, armazenados por 28 dias na mesma condição de temperatura. Ambos trabalhos apresentaram valores semelhantes aos resultados desta pesquisa.

Conforme dados apresentados na Figura 3, a cepa probiótica manteve-se em concentrações elevadas (acima de 6 log UFC/mL) nos quatro ensaios realizados. Segundo Jack, Tagg e Ray (1995), são necessários níveis mínimos de 2×10^6 UFC/mL para que bactérias probióticas exerçam ações inibitórias frente a cepas patogênicas. O acompanhamento da viabilidade probiótica permitiu constatar a resistência da cepa *L. acidophilus* LAFTI L10 nos iogurtes de leite de cabra durante o período de armazenamento, mesmo em condições adversas e de intensa competição com as culturas lácticas e patogênicas presentes no meio.

Figura 3 – Contagem de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 em iogurte de leite de cabra contaminado com *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Staphylococcus aureus* (b), com *Salmonella typhimurium* (c) e com *Escherichia coli* (d) durante 42 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C

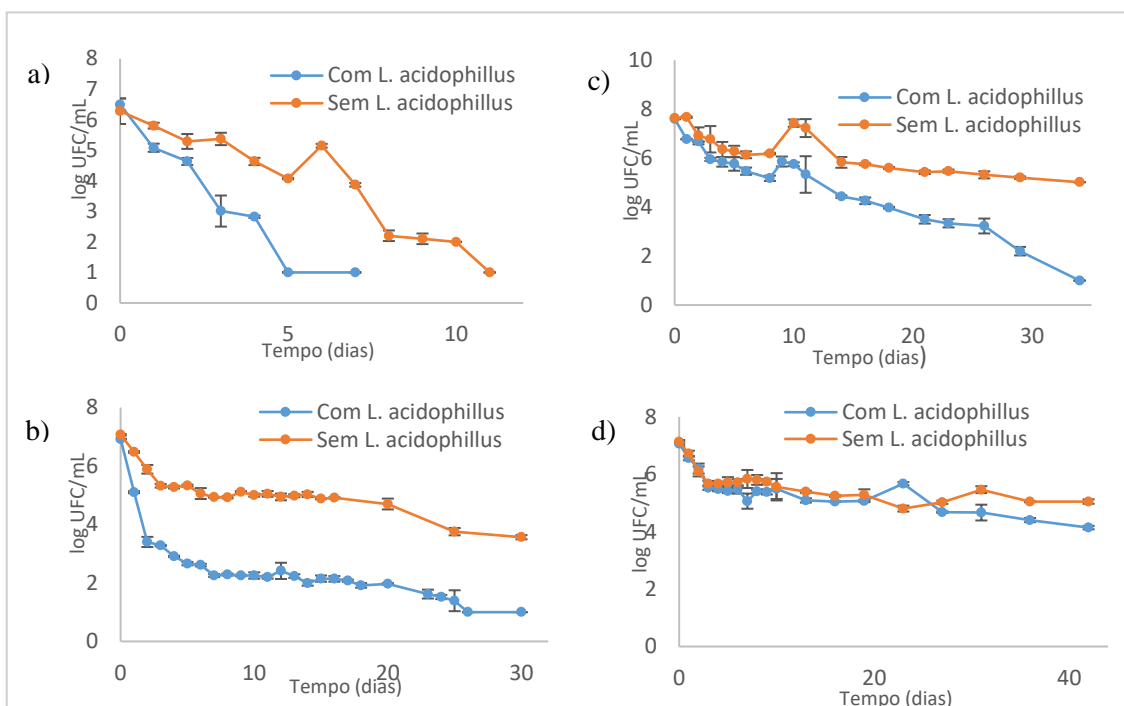


Com exceção do iogurte contaminado com *Staphylococcus aureus* (Figura 3), observou-se um declínio na concentração final de *L. acidophilus* em ambas as amostras ($p < 0,05$), redução menor que 1 ciclo logarítmico, devido a possível competição por nutrientes e também a intensa atividade metabólica das demais culturas presentes no meio, principalmente de *L. bulgaricus*, que resulta na produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que afetam a estabilidade das cepas probióticas (DONKOR et al, 2006; GOPAL, 2011; DA SILVA et al., 2016).

4.7.2 Avaliação da ação antagonista de *L. acidophilus* frente as estirpes patogênicas

Na Figura 4 são apresentadas as concentrações das quatro estirpes patogênicas nos iogurtes IO e I1, durante todo o período de armazenamento das amostras sob refrigeração a 4 °C.

Figura 4 – Comparativo da viabilidade de *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Salmonella typhimurium* (c) e *Escherichia coli* (d) em iogurte integral de leite de cabra sem adição de *L. acidophilus* (I0) e com adição de *L. acidophilus* (I1) durante armazenamento a 4 ± 1 °C



A partir dos dados apresentados na Figura 4, observa-se que em todos os casos houve uma maior inibição das cepas patogênicas nas amostras com adição de *L. acidophilus* (I1) ($p < 0,05$). Percebe-se também que as bactérias lácticas (BAL) induziram uma acentuada redução na concentração microbiana patogêna nos primeiros dias de armazenamento, seguida por um período de maior estabilidade, exceto para o caso da *Pseudomonas aeruginosa*. As fases estacionárias observadas evidenciam a capacidade de adaptação dos microrganismos mesmo em condições ambientais desfavoráveis (SHINOHARA et al., 2018).

No iogurte contaminado com *P. aeruginosa* (Figura 4a), observou-se uma redução de mais de 5,5 ciclos logarítmicos do patógeno nas amostras com probiótico (I1) no quinto dia, enquanto a mesma redução foi constatada apenas após 11 dias nas amostras sem adição de *L. acidophilus* (I0).

Nas amostras I1 contaminadas com *Staphylococcus aureus* (Figura 4b), a contagem do patógeno atingiu o limite de detecção do método ($\log 1$ UFC/mL) após 30 dias e, ao final deste mesmo período, a concentração desta bactéria nas amostras I0 foi de 3,56 log UFC/mL.

Em relação ao iogurte contaminado com *Salmonella typhimurium* (Figura 4c), a

inibição observada nas amostras I1 foi de aproximadamente 6,6 ciclos logarítmicos ao final de 34 dias, contra a inibição de 3,29 ciclos observada nas amostras I0.

Na Figura 4d observa-se que, embora a contagem final de *Escherichia coli* tenha sido menor no iogurte com probiótico, o microrganismo patogênico manteve-se com viabilidade acima de 4 log UFC/mL em ambas as amostras (I0 e I1) ao final do período de armazenamento de 42 dias.

A ação deletéria observada contra os agentes patogênicos pode ser explicada por alguns fatores extrínsecos e intrínsecos. A temperatura de refrigeração (4 ± 1 °C) e o pH baixo (4,6) são fatores limitantes de crescimento e redução da maioria das bactérias patogênicas. Durante a etapa de fermentação ocorre a queda do pH devido a metabolização da lactose produzindo ácido láctico, tornando-o inóspito para a maioria dos microrganismos deteriorantes e patogênicos, que continua ocorrendo mesmo durante a estocagem do produto, processo também conhecido como pós-acidificação (ORDÓÑEZ, 2007; LOBACZ; KOWALIK; TARCZYNSKA, 2013; CRUZ et al., 2019).

A melhor eficiência dos iogurtes I1 em relação a inibição patogênica pode ser justificada pela produção de metabólitos antimicrobianos produzidos pelas células probióticas de *Lactobacillus acidophilus*. A ação inibitória ocasionada pela ação do *Lactobacillus* deve-se a produção de bacteriocinas e peptídeos bacterianos ou proteínas ativas, estes sintetizam diferentes tipos de enzimas hidrolíticas e em menor quantidade lipases e esterases, que agem contra bactérias Gram positivas, isso confirma o seu potencial na aplicação das indústrias de alimentos como conservante natural (OZOGUL; HAMED, 2016, CRUZ et al., 2019).

Entretanto, embora menos acentuadas, também foram observadas reduções das estirpes patogênicas nas amostras de iogurtes I0. Este resultado pode ser explicado pela propriedade das culturas iniciadores de iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) que pela ação da fermentação reduz a quantidade de carboidratos disponíveis e resulta em uma variedade de pequenas moléculas orgânicas de massa molecular que exibem atividade antimicrobiana, sendo as mais comuns o ácido láctico, acético e propiônico. Dos ácidos, o ácido acético é o inibidor mais forte e possui uma ampla gama de atividades inibitórias, inibindo leveduras, bolores e bactérias, enquanto o ácido propiônico exerce um forte efeito antimicrobiano, principalmente em relação a leveduras e bolores, além da competição microbiana por nutrientes (SALMINEN et al., 2004, BARRANTES et al., 2004; DUARTE et al., 2013).

Outro fator apontado por alguns autores, sugere que a inibição de patógenos está

relacionada ao melhor aproveitamento dos recursos do ambiente pelas bactérias ácido-lácticas. Conhecido como “Efeito Jameson”, baseia-se na competição entre espécies microbianas, na qual uma espécie maximiza seu crescimento e densidade populacional, ao mesmo tempo que inibe o crescimento da outra (AČAI et al., 2015; FERREIRA; FERREIRA, 2011).

Similarmente a esta pesquisa, Duarte et al. (2016) estudaram a ação antagonista de *L. acidophilus* frente a algumas cepas patogênicas inoculadas em leite fermentado. Com uma concentração inicial de patógenos de 8,4 log UFC/mL, os pesquisadores observaram que *E. coli* não foi mais detectável a partir do vigésimo quinto dia, enquanto as células de *S. aureus* permaneceram viáveis durante 35 dias de armazenamento a 5 °C, tendo uma redução de cinco unidades logarítmicas durante este período.

Em outro estudo semelhante, Barrantes et al. (2004) estudaram o efeito inibitório dos probióticos *Lactobacillus casei* e *L. acidophilus* diante de *E. coli* O157:H7 inoculados em iogurtes comerciais, observando que no iogurte tradicional houve a sobrevivência da cepa patogênica mesmo após 28 dias de armazenamento do produto sob refrigeração, enquanto no iogurte com probiótico foi observada uma inibição total (limite mínimo de detecção) após 16 dias. Melhores resultados de inibição de *E. coli* do trabalho de Barrantes podem ser justificados pelo uso combinado dos probióticos *L. casei* e *L. acidophilus*, enquanto nesta pesquisa foi utilizado apenas uma espécie probiótica.

Em outra pesquisa, Cutrim et al. (2016) fizeram um estudo sobre a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em diferentes tipos de iogurte, observando que esta bactéria foi reduzida a níveis não detectáveis após períodos que variaram de 9 a 22 dias de armazenamento das amostras, evidenciando a capacidade de tolerância desse microrganismo a condições ácidas. Entretanto, em comparação com a presente estudo, a pesquisa de Cutrim e colaboradores apresentou maior efeito inibitório contra o patógeno, e justifica-se pelo fato da contaminação ter ocorrido antes da fermentação do iogurte, sendo esta etapa responsável pela redução do inóculo inicial.

Já Cirone et al. (2013), em estudo sobre a viabilidade de *Salmonella Enteritidis* em iogurte, constataram que este patógeno resistiu aos processos de fermentação e armazenamento do alimento, com redução de apenas uma unidade logarítmica após 20 dias de experimento. Apesar da semelhança de resultados quanto a resistência de *Salmonella* em iogurte, mesmo após algumas semanas de contaminação, o presente trabalho apresentou uma maior taxa de declínio patogênico, justificado pela adição da cultura de *L. acidophilus*, diferente da pesquisa de Cirone e colaboradores, a qual foi

realizada com iogurte tradicional sem adição de cultura probiótica.

Morales et al. (2020) estudaram o efeito antagonista *in vitro* de algumas estirpes de bactérias ácido lácticas diante de algumas de cepas de *Pseudomonas* spp., concluindo que a espécie *L. sakei* apresentou a melhor capacidade biopreservativa, provocando a redução de três ciclos logarítmicos do microrganismo deteriorante no período de 6 dias. Este resultado, apesar das diferentes condições, corrobora com os resultados da atual pesquisa, evidenciando a eficiência das bactérias do gênero *Lactobacillus* quanto ao antagonismo frente a estirpes de *Pseudomonas*.

4.7.3 Modelagem matemática

A coleta de dados de concentração de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *E. coli* em iogurte integral de leite de cabra em laboratório, durante o armazenamento das amostras, e auxílio dos softwares de modelagem DMFit e GInaFIT, permitiram obter as curvas dos dados experimentais e dos modelos primários de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull, as quais são apresentadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Figura 5 – Comparação da inibição observada e prevista de *Pseudomonas aeruginosa* para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a 4 ± 1 °C

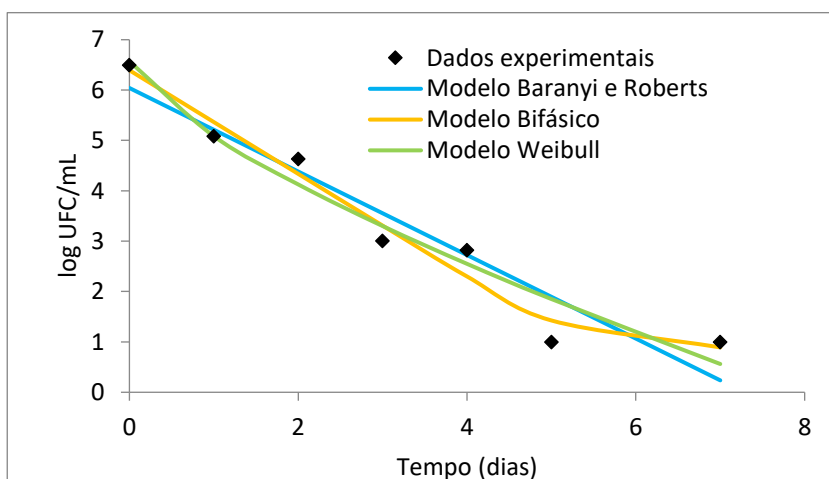


Figura 6 – Comparação da inibição observada e prevista de *Staphylococcus aureus* para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a 4 ± 1 °C

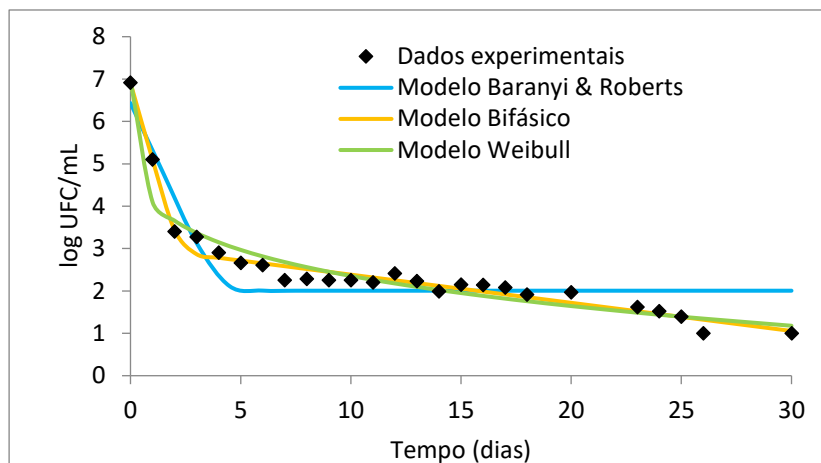


Figura 7 – Comparação da inibição observada e prevista de *Salmonella typhimurium* para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a 4 ± 1 °C

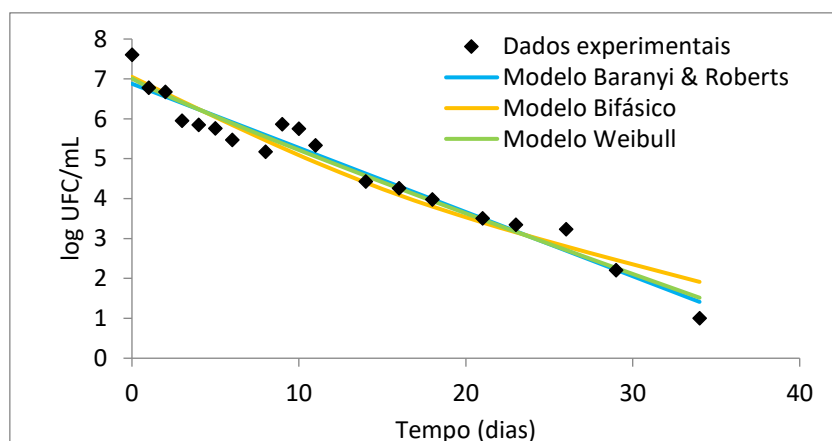
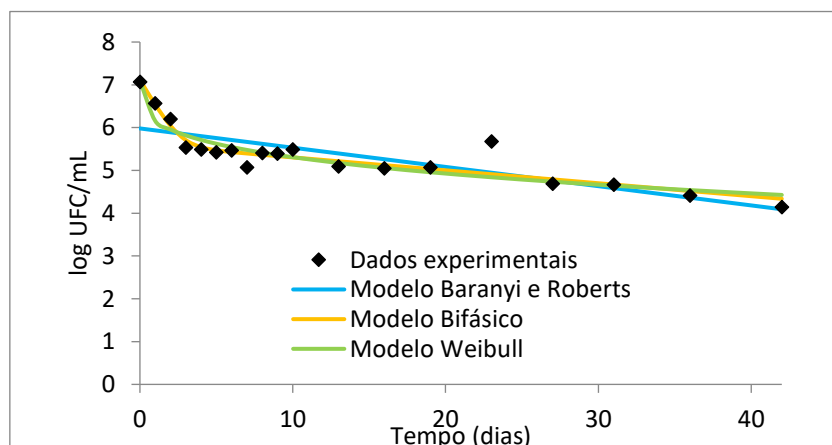


Figura 8 – Comparação da inibição observada e prevista de *Escherichia coli* para os modelos Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull em iogurte integral de leite de cabra armazenado a 4 ± 1 °C



Com a modelagem dos dados para *P. aeruginosa* (Figura 5) obtiveram-se as curvas de inibição referentes aos modelos primários de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull. Conforme parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5, não foi constatado tempo da fase de latência (λ) utilizando o modelo de Baranyi e Roberts, e a taxa de inibição cinética μ foi de $-0,83 \pm 0,01$ log UFC/mL/dia, parâmetro que diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais microrganismos analisados. Do modelo Bifásico, obtiveram-se as taxas de decaimento k_1 e k_2 com valores de 2,37 UFC/mL/dia e 0,08 UFC/mL/dia, respectivamente, indicando que o decaimento microbiano foi mais intenso nos primeiros dias do período analisado. Em relação aos parâmetros do modelo Weibull para *P. aeruginosa*, destaca-se o tempo para primeira redução decimal, $\delta = 0,58 \pm 0,38$ dia, enquanto o tempo para a redução de quatro ciclos logarítmicos, D4, foi de $3,99 \pm 0,71$ dias, sendo o menor tempo observado dentre os quatro ensaios realizados.

Com relação a modelagem dos dados obtidos para *S. aureus* (Figura 6) e parâmetros cinéticos da Tabela 5, observa-se uma taxa de inibição cinética μ (modelo Baranyi e Roberts) de $-1,11 \pm 0,07$ log UFC/mL/dia, sendo esta a maior velocidade de decaimento máxima em comparação com as taxas dos demais patógenos estudados ($p < 0,05$). Este modelo também apresentou um valor de concentração microbiana mínima (Y_{\min}) de 2,01 UFC/mL já no quinto dia, permanecendo estável até o final do acompanhamento no trigésimo dia. Conforme visualizado pelo gráfico da Figura 6, a concentração de *S. aureus* teve a redução inicial mais acentuada dentre os ensaios, confirmada pelos valores da taxa de decaimento k_1 (modelo Bifásico) de $4,18 \pm 0,36$ UFC/mL/dia e do tempo da primeira redução decimal δ (modelo Weibull) de apenas $0,01 \pm 0,01$ dia.

Diferente dos ajustes dos demais patógenos, a modelagem de dados para *S. typhimurium* (Figura 7), indicou uma maior resistência desta estirpe durante os primeiros dias de armazenamento. Na Tabela 5 observa-se que a taxa de decaimento k_1 (modelo Bifásico) para este microrganismo foi igual a $0,48 \pm 0,15$ UFC/mL/dia e a primeira redução decimal foi com $5,29 \pm 1,47$ dias (δ do modelo Weibull), sendo o maior tempo observado nesta pesquisa. O ajuste ao modelo de Baranyi e Roberts apresentou uma taxa de inibição cinética μ de $-0,16 \pm 0,01$ log UFC/mL/dia, diferindo também dos valores referentes as demais bactérias ($p < 0,05$).

Em relação aos dados para *E. coli* (Figura 8), os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5 confirmam que esta foi a cepa mais resistente das quatro estudadas. No modelo Weibull, apesar de não apresentar diferença significativa em relação a todos os patógenos (p

> 0,05) para o parâmetro δ (aproximadamente 1,25 dias), não foi possível determinar o tempo de inativação de quatro unidades logarítmicas de concentração das células (D4), uma vez que este tempo foi superior ao período total de 42 dias. O modelo de Baranyi e Roberts indicou a menor taxa de inativação máxima para *E. coli*, com um valor de μ de $-0,04 \pm 0,00$ log UFC/mL/dia, ratificando que esta foi a cepa de maior adaptação e sobrevivência no produto. Além desses, o modelo Bifásico apontou valores de taxas de decaimento k_1 e k_2 de $1,41 \pm 0,41$ UFC/mL/dia e $0,07 \pm 0,01$ UFC/mL/dia, respectivamente.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos da modelagem de inativação de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* em iogurte de leite de cabra integral para os modelos de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull

Modelo	Microrganismo	Parâmetros cinéticos			
		μ	y_0	$y_{\text{mín}}$	
Baranyi e Roberts	<i>P. aeruginosa</i>	$-0,83 \pm 0,01^c$	$6,04 \pm 0,00^c$	-	
	<i>S. aureus</i>	$-1,11 \pm 0,07^d$	$6,43 \pm 0,00^b$	2,0057	
	<i>S. typhimurium</i>	$-0,16 \pm 0,01^b$	$6,88 \pm 0,00^a$	-	
	<i>E. coli</i>	$-0,04 \pm 0,00^a$	$5,98 \pm 0,00^c$	-	
Bifásico	<i>P. aeruginosa</i>				
	<i>S. aureus</i>				
	<i>S. typhimurium</i>				
	<i>E. coli</i>				
Weibull	<i>P. aeruginosa</i>				
	<i>S. aureus</i>				
	<i>S. typhimurium</i>				
	<i>E. coli</i>				

μ : taxa de crescimento máxima (log UFC/mL/dia); λ : tempo da fase lag (dias); $y_{\text{máx}}$: concentração final (log UFC/mL); C: variação entre $y_{\text{máx}}$ e y_0 (log UFC/mL); δ : tempo da primeira redução decimal (dias); p: parâmetro de curvatura; f: concentração de células menos resistentes (log UFC/mL); k_1 : taxa de decaimento microbiano da primeira fase (log UFC/mL/dia); k_2 : taxa de decaimento microbiano da segunda fase (log UFC/mL/dia); t: tempo de redução de 4 ciclos logarítmicos microbiano (dias). a-b Dado observado \pm desvios padrão com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A Tabela 6 apresenta os valores dos índices estatísticos calculados através dos ajustes dos dados de concentração microbiana de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *E. coli* em iogurte de leite de cabra para os modelos primários de Baranyi e Roberts, Bifásico e

Weibull.

Tabela 6: Índices estatísticos obtidos da modelagem de inativação de *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, *Staphylococcus aureus* CCCD-S009, *Salmonella typhimurium* CCCD-S004 e *Escherichia coli* CCCD-E009 em iogurte de leite de cabra integral para os modelos de Baranyi e Roberts, Bifásico e Weibull

Modelo	Microrganismo	Índices estatísticos				
		MSE	RMSE	R ²	bias	Exatidão
Barany e	<i>P. aeruginosa</i>	0,0243	0,1560	0,9590	0,9797	1,0757
Roberts	<i>S. aureus</i>	0,0559	0,2365	0,8399	0,8776	1,1395
	<i>S. tiphymurium</i>	0,0190	0,1378	0,9504	1,0106	1,0717
	<i>E. coli</i>	0,0346	0,1860	0,6237	1,0023	1,0558
Bifásico	<i>P. aeruginosa</i>	0,3119	0,5585	0,9180	1,0205	1,0757
	<i>S. aureus</i>	0,0339	0,1840	0,9781	1,0062	1,0886
	<i>S. tiphymurium</i>	0,2107	0,4590	0,9242	1,0203	1,0990
	<i>E. coli</i>	0,0586	0,2421	0,8814	1,0010	1,0263
Weibull	<i>P. aeruginosa</i>	0,2079	0,4560	0,9454	0,9797	1,0757
	<i>S. aureus</i>	0,0975	0,3122	0,9369	1,0059	1,1026
	<i>S. tiphymurium</i>	0,1440	0,3795	0,9482	1,0129	1,0754
	<i>E. coli</i>	0,0890	0,2983	0,8200	1,0014	1,0365

MSE: erro médio quadrático; RMSE: raiz do erro médio quadrático; R²: coeficiente de determinação; bias: fator bias ; exatidão: fator exatidão

Com o tratamento dos dados experimentais foi possível calcular os índices estatísticos e, a partir deles, avaliar quais modelos melhor descreveram a inibição dos quatro patógenos estudados.

O coeficiente de determinação (R²) é uma quantificação que indica o quanto o modelo é capaz de explicar os dados observados. Este índice varia de 0 a 1, no qual o 0 indica que o modelo matemático não explica o comportamento de dependência das variáveis, e 1 indica que o modelo explica esta dependência com perfeição (MONTGOMERY; RUNGER; HUBELE, 2014). Conforme apresentado na Tabela 6, os valores de R² variaram de 0,62 (modelo Baranyi e Roberts para *E. coli*) a 0,98 (modelo Bifásico para *S. aureus*).

O erro médio quadrático (MSE) e sua respectiva raiz (RMSE) é a diferença entre o valor observado e o valor estimado e, quanto mais próximo de zero o valor do coeficiente MSE for, melhor é o modelo (DOROTA et al., 2014; ROSS, 1996). No entanto, como exemplificado por Ratkowsky (2003), RMSE é índice mais adequado para avaliação de

modelos não lineares.

Segundo Ross et al. (2000), um fator bias entre 0,9 e 1,05 é considerado bom, valores entre 0,7 e 0,9 ou entre 1,06 e 1,15 são aceitáveis. Neste estudo apenas o modelo de Baranyi e Roberts para *S. aureus* apresentou um fator bias fora da faixa ótima, com valor de 0,88, indicando que este modelo subestima os valores reais.

Com base nos índices apresentados na Tabela 6, observa-se que o modelo Baranyi e Roberts apresentou o melhor ajuste aos dados de *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*, enquanto o modelo Bifásico foi o mais adequado para explicar a inibição da cepa de *S. aureus* nas amostras de iogurte. Para o caso *Pseudomonas*, o modelo Baranyi e Roberts apresentou melhor RMSE (0,1560) e R^2 (0,9590) em relação aos demais modelos; o mesmo se repetiu para o caso *Salmonella*, com valores de RMSE igual a 0,1378 e R^2 de 0,9504. Para o caso *Escherichia coli*, o modelo Baranyi e Roberts apresentou melhor valor de RMSE (0,1860), embora o modelo Bifásico apareceu com o coeficiente de determinação mais próximo de 1 ($R^2 = 0,8814$). O modelo Bifásico foi o que apresentou melhor ajuste para o caso *Staphylococcus*, com menor RMSE (0,1840) e maior R^2 (0,9781).

Bednarko-Młynarczyk et al. (2015) estudaram o comportamento de *Staphylococcus aureus* em iogurte de leite de cabra e, ao analisarem os ajustes a diferentes modelos primários, concluíram que o modelo de Baranyi e Roberts descreveu com maior precisão a cinética de sobrevivência deste microrganismo, resultado que diferiu desta pesquisa. Essa diferença pode ser justificada pelo fato dos autores não terem avaliados os modelos primários Bifásico e de Weibull, além do estudo ter sido realizado com iogurte de leite caprino tradicional, sem probiótico, fato relevante quanto a cinética de inibição do patógeno *S. aureus*.

Savran et al. (2017) estudaram a adequação do modelo de Baranyi e Roberts aos dados de sobrevivência de *Salmonella typhimurium* no processo de fermentação de iogurte, encontrando valores de RMSE que variaram de 0,02 a 0,06. Comparando com o presente estudo, apesar de focados em diferentes etapas, um na fermentação e outro no armazenamento, ambos concluíram que o modelo de Baranyi e Roberts é o mais adequado para explicar o comportamento deste patógeno em leites fermentados.

4.8 CONCLUSÃO

Foi observada uma maior redução dos patógenos nas amostras de iogurte com adição da cepa probiótica *L. acidophilus* LAFTI L10, atestando sua propriedade antagônica diante das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004, *Staphylococcus aureus* CCCD-S009,

Salmonella typhimurium CCCD-S004 e *Escherichia coli* CCCD-E009. A máxima atividade inibidora foi verificada para *P. aeruginosa* e a mínima para *E. coli*.

O ajuste dos dados de inibição microbiana apontou que o modelo primário de Baranyi e Roberts foi o que melhor descreveu o comportamento das cepas de *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*, enquanto o modelo Bifásico foi melhor ajustado aos dados cinéticos de *S. aureus* nas amostras de iogurte de leite de cabra com probiótico. Nestes casos, o parâmetro estatístico RMSE foi próximo a zero, enquanto o coeficiente de determinação (R^2) mais se aproximou de uma unidade, indicando que os modelos descrevem adequadamente os dados microbianos reais.

REFERÊNCIAS

AČAI, P.; VALÍK, L.; MEDVED'OVÁ, A.; ROSSKOPF, F. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* and lactic acid bacteria in milk. **Food Science and Technology International**. v. 22, p. 475-484, 2015.

ALVARENGA, V. O.; CAPPATO, L. P.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Aspectos quantitativos de segurança de produtos lácteos: microbiologia preditiva e avaliação quantitativa de riscos. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Elsevier, p. 145-167.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. **Role of predictive microbiology in food preservation**. In: BHAT, R.; ALIAS, A.K.; PALIYATH, G. **Progress in Food Preservation**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2012.

ARTURSSON, K.; SCHELIN, J.; LAMBERTZ, S. T.; HANSSON, I.; ENGVALL, E. O. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 120-127, 2018.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M. L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p. 293-297, 2004.

BEDNARKO-MŁYNARCZYK, E.; SZTEYN, J.; BIAŁOBRZEWSKI, I.; WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, A.; LIEDTKE, K. Modeling the kinetics of survival of *Staphylococcus aureus* in regional yogurt from goat's milk. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, n. 18, p. 39-45, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa

Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa nº68 - Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 12 de dezembro 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA>. Acesso em 10 jul. 2019.

CALDERON, O; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y com probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, v.57, n.1, 2007.

CIRONE, K.; HUBERMAN, Y.; MORSELLA, C.; MEÑDEZ, L.; JORGE, M.; PAOLICCHI, F. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during preparation and storage of yogurt. **ISRN Microbiology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. The Microbiology of Milk. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, 1990. 301p., v. 1. p.77-114.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. Q. F.; CORASSIN, C. H. Microbiologia, Higiene e Controle de qualidade no processamento de leite e derivados. 1º edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2019. 356p.

CUTRIM, C. S; DE BARROS, R. F.; DA COSTA, M. P.; FRANCO, R. M.; CONTE-JUNIOR, C. A.; CORTEZ, M. A. S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and storage of traditional and low lactose yogurt, **LWT – Food Science and Technology**, v. 70, p. 178–184, 2016.

DA SILVA, F. C. G.; DALAQUA, S.; DE AZEVEDO, E. C.; DE CAMPOS, G. M., RAGHIANTE, F.; MARTINS, O. A. Perfil do ácido láctico no prazo de validade de iogurte natural integral Profile of lactic acid within validity of full natural yogurt. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 595–603, 2016.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **Internacional Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DOROTA, Z.; DANUTA, K.; ANTONI, G.; MOTYL, I. Predictive Modelling of *Lactobacillus casei* KN291 Survival in Fermented Soy Beverage. **Journal of Microbiology**, v.52, p.169–178, 2014.

DUARTE, M. C. K.; CORTEZ, N. M. S.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.9, p. 26-36, 2013.

DUARTE, M. C. K. H.; CORTEZ, N. M. S.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M.; MACEDO, N. C. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

FDA – U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogens, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>. Acesso em 20 jul. 2019.

FAZILAH, N, F.; ARBAKARIYA, B. A.; MOHD, E. K.; LEONARDO, R.; MURNI, H. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v.48, p.387–399, 2018.

FERREIRA, E. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Implications of wood in artisanal cheese identity and safety. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 66, n.381, p.13-20, 2011.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 95-105, 2005.

GOPAL, P. K. Lactic acid bacteria| *Lactobacillus* ssp.: *Lactobacillus acidophilus*. In: Encyclopedia of Dairy Science. Elsevier, 2 ed, p. 91-95, 2011.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., CALDER, P. C. (2014). Expert consensus document, The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

ISO. Milk products – Enumeration of Presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a Selective Medium – Colony-count Technique at 37 Degrees C. **ISO 20128/IDF 192:2006**. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2006.

JACK, R.; TAGG, J.; RAY, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Microbiological reviews**, v.59, p. 171-200, 1995.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 26, p. 927-939, 2018.

KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; HEIMBACH, J.; BAÑARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; Lalonde, M. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v.32, p.99-103, 2015.

LOBACZ, A.; KOWALIK, J.; TARCZYNSKA, A. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mold-ripened cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3449-3460, 2013.

MA, Y.; DING, S.; FEI, Y.; LIU, G.; JANG, H.; FANG, J. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, v.106, 2019.

MORALES, P.; AGUIRRE, J.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G. Comparison of *in vitro* and *in situ* antagonism assays as tools for the selection of bio-preservative lactic acid bacteria (LAB) in poultry meat, **LWT**, v. 117, 2020.

ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnología de Alimentos: alimentos de origem animal*. Editora Artmed, v. 2, 2007. 279p.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

PEREIRA, V. G.; GOMÉZ, R. J. H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.28, n. 2, p. 229-240, 2007.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; BAINES, S. K.; BALTHAZAR, C. F.; CRUZ, A. G.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q., PIMENTEL, T. C.; WITTER, A. E.; NAUMOVSKI, N.; GRAÇA, J. S.; SANT'ANA, A. S.; AJLOUNI, S.; VASILJEVIC, T. Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 867-882, 2019.

ROBAZZA, W. S.; DACOREGGIO, M. V.; GALVÃO, A. C.; SCHITTLER, L. Modelagem do Crescimento de *Salmonella Enteritidis* em Maionese Adicionada de Óleo Essencial de Orégano. **Vetor**, Rio Grande, v. 26, p. 51-60, 2016.

VAN DE CASTEELE, S.; VANHEUVERZWIJN. T; RUYSSSEN, T.; VAN ASSCHE, P.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v, 16, p. 1470-1476, 2006.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V.; OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, 3^oEdition, Marcel Dekker, New York, 2004.

SAVRAN, D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; HALKMAN, A. K.; Modeling the survival of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* during the fermentation of yogurt, **Food Science and Technology International**, v. 0, p. 1–7, 2017.

SCOTT, S.; Measurement of Microbial Cells by Optical Density, **Journal of Validation Technology**, v. 17, p. 46-49, 2011.

SHINOHARA, N. K. S.; FREITAS, F.; PIRES, E. F.; ANDRADE, S. A. C.; FILHO, J. L. L.; SOUSA, P. H. M. Statistical evaluation of mathematical models for *Salmonella*

typhimurium growth, **Revista Geama**, v. 4, p. 33-38, 2018.

SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C. C.; KALAVATHY, R.; LIANG, J. B.; ALITHEEN, N. B.; JAHROMI, M. F.; HO, Y. W. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

SILVA, F. A.; ELIEIDY, G. O.; FIGUEIRÊDO, M. F.; SAMPAIO, K. B.; SOUZA, E. L.; DE OLIVEIRA, C. E. V.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA, R. C. R. E. 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.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probiotics and fermented dairy foods: a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, p.49-57, 2013.

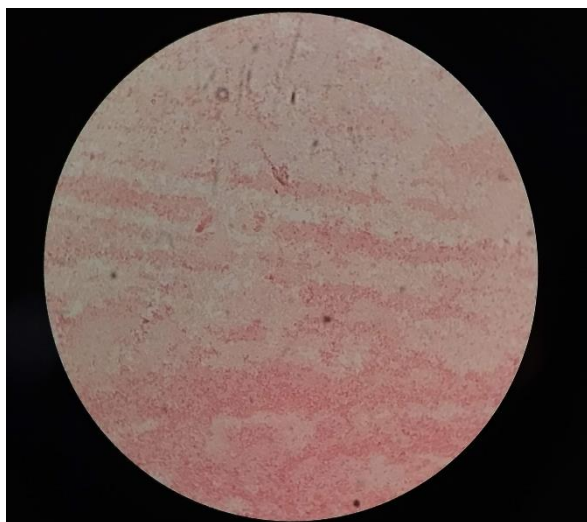
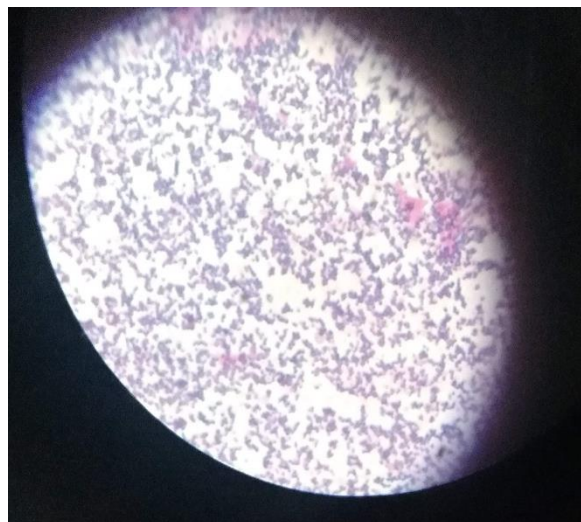
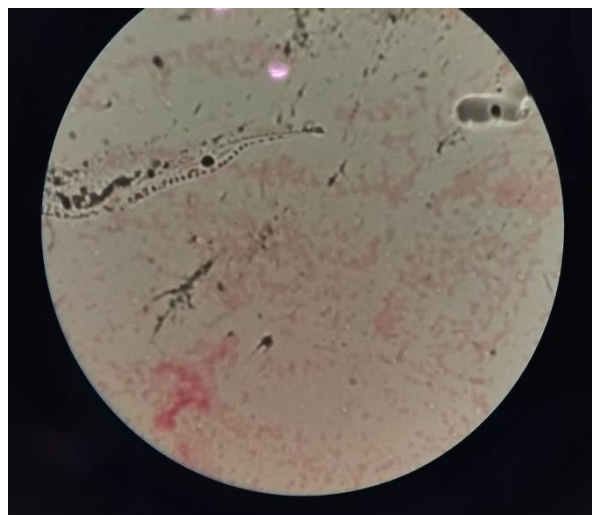
WONG, A. Y.; LAI, J. M. C.; CHAN, A. W. Regulations and protection for functional foodproducts in the United States. **Journal of Functional Foods**, v.17, p.540–551, 2015.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O iogurte integral de leite de cabra demonstrou ser uma matriz alimentar favorável ao crescimento e viabilidade da cepa probiótica de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10. Além disso, o presente estudo observou a ação antagonista deste probiótico diante de estirpes patogênicas de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Escherichia* nas amostras de iogurte, indicando que sua adição em produtos lácteos contribui para maior segurança dos consumidores destes alimentos. Esta atividade inibidora foi, provavelmente, consequência do baixo pH do meio e liberação de metabólitos antimicrobianos produzidas pelas células de *L. acidophilus*.


A modelagem primária foi importante para se conhecer os modelos que mais adequadamente descreveram a cinética de crescimento e inibição dos microrganismos, obtendo-se uma relevante base de dados que pode ser utilizada pelas indústrias de laticínios, ajudando tanto na otimização de processos quanto no gerenciamento de risco. Entretanto, para um conhecimento mais completo, faz-se necessário um estudo com modelagem secundária, através de variações das condições ambientais dos alimentos contendo os microrganismos estudados.

APÊNDICES

Apêndice 1: COLORAÇÃO DE GRAM PARA CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS PATOGÊNICASColoração de Gram (-) para *P. aeruginosa*Coloração de Gram (+) para *S. aureus*Coloração de Gram (-) para *S. typhimurium*

ANEXOS

Anexo 1: POP Nº 20 DO LABORATÓRIO DE LEITE E DERIVADOS DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UFPE: PROCEDIMENTO PARA REATIVAÇÃO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS LIOFILIZADAS

 E ngenharia de A limentos	DEQ Departamento de Engenharia Química	POP 20 -PROCEDIMENTO PARA REATIVAÇÃO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS LIOFILIZADAS
Laboratório de Produtos de Origem animal (LEITE) da UFPE		

1. Objetivo

Estabelecer critérios técnicos para manipulação das cepas liofilizadas utilizadas para compor as formulações lácteas.

2. Aplicação

Aplica-se no desenvolvimento de formulações probióticas, nas aulas, trabalho de PIBIC, TCC e pesquisas desenvolvidas do Laboratório de Origem Animal do Curso de Engenharia de Alimentos da UFPE.

3. Documentos de Referência

- ✚ *BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. 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. Diário Oficial da União, p. 14. Brasília, DF, 2003.*
- ✚ Association of Official Analytical Chemists, 17th Edition, 2002.
- ✚ Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4^a ed. APHA, 2001.

4. Responsáveis

Colaboradores dos Laboratórios de Origem Animal.

5. Frequência

Em toda manipulação e ativação das cepas.

6. Procedimento

6.1 Materiais e equipamentos

- ✚ Cepas liofilizadas
- ✚ Meios de cultura e reagentes diversos
- ✚ Tubos de ensaio contendo meios de cultura recomendados.
- ✚ Bico de Bunsen.
- ✚ Álcool etílico a 70%.
- ✚ Algodão hidrófilo.
- ✚ Balança analítica.
- ✚ Alça de inoculação estéril.
- ✚ Pipetador com ponteira descartável estéril.
- ✚ Frascos criogênicos com tampa de rosca com capacidade para 10mL.
- ✚ Água destilada estéril.
- ✚ Pipetas estéreis
- ✚ EPI – luvas de procedimentos, máscara, touca.
- ✚ EPC – Capela de fluxo laminar

6.2 Procedimentos Prévios

- ✚ Retirar o frasco criogênico com o material com aproximadamente 12 horas de antecedência para refrigerador com temperatura controlada máx. de 10°C.
- ✚ Transferir todo o conteúdo do frasco criogênico para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido indicado para cada microrganismo (**Quadro 1**).
- ✚ Incubar os tubos com meio líquido (caldo) nas temperaturas, tempo e requerimento de oxigênio (Eh) recomendados para as diferentes linhagens, de acordo com o **Quadro 1**.
- ✚ Em seguida, as cepas já reativadas devem ser repicadas para os meios sólidos correspondentes (**Quadro 2**) para manutenção.
- ✚ Pode-se manter as cepas em Leite em pó desnatado reconstituído, segundo recomendações do fabricante; devendo este ser esterilizado previamente em autoclave a temperatura constante de 110°C por cinco minutos. Sendo retirado imediatamente para banho de gelo e mantido sob refrigeração até o momento do uso.

Quadro 1: Temperaturas, tempo de incubação e Eh em meio líquido, recomendados para as cepas

padrão de referência.

Microrganismo	Referência	Meio Líquido	T (°C)	Eh	Tempo (horas)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 LAFTI L10*	Caldo MRS	36±1	-	24±2
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334 LAFTI L 26*	Caldo MRS	36±1	-	24±2
<i>Bifidobacterium lactis</i>	LAFTI B94*	Caldo MRS	36±1	-	24±2

MRS = Man Rogosa & Sharpe

*Globalfood

7. Manutenção de cepas

- ✚ Repicar com alça de inoculação, as cepas reativadas para os tubos de ensaio estéreis tamponados, contendo os meios sólidos inclinados descritos no **Quadro 2**.
- ✚ Incubar nas condições de temperatura, requerimento de oxigênio (Eh) e tempo, indicados para cada cepa, conforme as instruções do **Quadro 2**.

Quadro 2: Temperaturas, tempo de incubação e requerimento de oxigênio (Eh) em meios sólidos, recomendados para cepas padrão.

Microrganismo	Referência	Meio Sólido	Eh	T(°C)	Tempo (h)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 LAFTI L10*	MRSA	-	36 ± 1	48± 2
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334 LAFTI L 26*	MRSA	-	36 ± 1	48± 2
<i>Bifidobacterium lactis</i>	LAFTI B94*	MRSA	-	36 ± 1	48± 2

MRSA = Agar de Man Rogosa & Sharpe

8. Estocagem das cepas

- ✚ Esterilizar os frascos criogênicos com tampa em autoclave por 15 min a temperatura de 121°C ± 1°C.

- ✚ Rotular os frascos estéreis com as informações: Identificação da cepa, número de ordem (1, 2, 3... 14), data (mês e ano), fabricante/lote e rubrica do colaborador.
- ✚ Com auxílio de alça de inoculação estéril, desprender o material biológico do meio sólido inclinado.
- ✚ Fazer uma suspensão do material biológico desprendido utilizando a solução estéril (Leite reconstituído estéril) para o frasco criogênico, em condições assépticas, com auxílio de pipetador com ponteira descartável estéril.
- ✚ Retornar para o frasco criogênico assepticamente.
- ✚ Lacrar as tampas dos frascos com fita adesiva e rubricar o lacre.
- ✚ Levar para refrigeração, os frascos onde permanecerão por aproximadamente 2 horas.
- ✚ Estocar os frascos em “freezer” por até 12 meses.