

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE**  
**CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO**

**CAROLINA MOREIRA DE SANTANA**

**QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO ADICIONADO DE *L.*  
*acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

**CUITÉ - PB**

**2015**

CAROLINA MOREIRA DE SANTANA

**QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO ADICIONADO DE *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

Cuité - PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S232q Santana, Carolina Moreira de.

Queijo *petit-suisse* caprino adicionados de *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico. / Carolina Moreira de Santana. – Cuité: CES, 2015.

54 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

1. Micro-organismo probiótico. 2. Condições gastrointestinais. 3. Efeito antibacteriano. I. Título.

CDU 615.874.2

CAROLINA MOREIRA DE SANTANA

**QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO ADICIONADO DE *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em 12 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

---



Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Universidade Federal de Campina Grande

Orientador

---

Profa. MSc. Carolina de Miranda Gondim

Universidade Federal de Campina Grande

Examinador

---

Prof. MSc. Jefferson Carneiro de Barros

Universidade Federal de Campina Grande

Examinador

Cuité - PB

2015

*Dedico este trabalho aos meus pais e a todos os meus familiares por todo o apoio, carinho, incentivo, fé, amor, compreensão, por terem acreditado em mim e por não medirem esforços para que pudesse ir em busca desse sonho. Minha terna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este momento pudesse ser concretizado.*

***Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades lançadas em meu caminho e por estar constantemente ao meu lado, ajudando-me a superar todo e qualquer obstáculo, sendo minha fortaleza e refúgio nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Missias e Jacinta, que em todos os momentos apoiaram a minha educação e ensinaram-me os valores da vida. Esta conquista é de vocês.

Aos meus irmãos: Isabela, Estela e Gabriel, meu muito obrigada por tudo que vocês são e significam para mim. Os meus preciosos sobrinhos Karlla Vitória e Pedro Lucas, meus melhores e maiores presentes de Deus, obrigada pelo amor puro e doce de vocês.

A minha amada família pelos incentivos nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Particularmente sou grata às minhas tias Raimunda, Doralice, Luci e Brígida por todo carinho direcionando a mim, com seus cuidados maternos me foram base para continuar a luta.

Agradeço aqui em especial a meu cunhado Edson Rolim pela sua amizade, disponibilidade, companheirismo de sempre e cuidado comigo.

Ao meu namorado Weslei, por toda compreensão, carinho e amor, por permanecer ao meu lado me dando força e coragem mediante as aflições da vida. Meu presente de Deus enviado para cuidar de mim.

A todos os meus colegas de classe que durante cinco anos de curso se fizeram eternos em minha vida e aos quais tenho um apreço especial por cada um que cruzou meu caminho. Não poderia deixar de expressar aqui o meu muito obrigada as minhas queridas, Amanda, Caroline, Laiane, Flaviany e Morganna, vocês foram muito mais que minhas amigas, foram minha família em Cuité, confidentes, irmãs, conselheiras, sobretudo companheiras de caminhada. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês!!

Obrigada a todos os meus amigos que me apoiaram e sempre estiveram ao meu lado durante esta longa jornada.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender a olhar além daquilo que se ver. Meu eterno agradecimento aos meus mestres pelas contribuições na minha vida acadêmica e por tanto influenciar na minha futura vida profissional.

E o que dizer a você minha flor Elieidy? Obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela força, por exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer e

principalmente pelo carinho. Agradeço por transmitir seus conhecimentos e por se fazer tão companheira no caminhar da construção desse trabalho, você foi mais que uma orientadora, foi amiga, foi um anjo em minha vida. “Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los” Rommel Castro. Obrigada por você ter sido a pessoa que me ajudou, que sonhou comigo e que me desafiou a voar mais alto.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

Obrigada Carol e Miny por ter conduzido comigo o projeto PIBIC que resultou nos resultados do meu TCC, vocês foram primordiais na obtenção dos resultados e no desenrolar das pesquisas. Meu eterno agradecimento a vocês.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para a frente.”*

***Soren Kierkegaard***

## RESUMO

SANTANA, C. M. **QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO ADICIONADO DE *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico.** 2015. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

A caprinocultura é uma atividade econômica em expansão, desenvolvida em todo o território nacional, difundindo-se em áreas que apresentam as mais diferenciadas características climáticas. No entanto, a insuficiente tecnologia utilizada no Brasil, aliada a não utilização de padrões de controle higiênico-sanitário para leite de cabra e seus derivados, têm-se constituído como um dos principais entraves na agroindústria especializada em produtos caprinos, estando a expansão deste setor em dependência da melhoria da estrutura de comercialização e da aplicação de tecnologia adequada aos padrões de qualidade exigidos. Produtos como queijos, iogurtes e bebidas lácteas, podem ser obtidos a partir do leite de cabra, utilizando-se de processos simples e acessíveis aos pequenos produtores, sendo essa uma alternativa para o aumento no consumo e agregação de valor aos produtos de origem caprina. Considerando-se que no setor lácteo os alimentos funcionais já se apresentam como uma realidade, de modo que muitas empresas os tem desenvolvido em suas linhas de produtos, uma alternativa para expansão deste mercado seria a produção de queijos com adição de culturas lácticas com potencial probiótico. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de elaborar e avaliar o potencial probiótico de queijo *petit-suisse* caprino. Para tanto, foi avaliada a sobrevivência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA -5) quando incorporado ao queijo *petit-suisse* caprino e exposto às condições de digestão simuladas *in vitro*. Também foi estudado o efeito inibitório desta bactéria probiótica contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* nessa matriz alimentar, durante 21 dias de armazenamento refrigerado. No final da digestão *in vitro*, a cepa probiótica testada no queijo apresentou uma manutenção das contagens de células viáveis (6,83 log UFC/g) no que diz respeito às contagens determinadas antes da exposição às condições da boca (6,68 log UFC/g). No tocante ao efeito inibitório deste micro-organismo probiótico contra os patogênicos, observou-se que esse efeito foi mais pronunciado contra *L. monocytogenes* durante todos os tempos de armazenamento, uma vez que, após 21 dias de armazenamento a presença de *L. acidophilus* inibiu cerca de 17,15% da população inicial desse patógeno. Todavia, quando os efeitos foram avaliados contra o *S. aureus*, não se observou efeito protetor efetivo em todos os dias de armazenamento, sendo observada apenas uma pequena inibição no 7º e no 14º dia de armazenamento, correspondendo a 1,42% e 1,36%, respectivamente. A partir destes resultados, constatou-se que o produto elaborado apresenta potencial probiótico, visto que a bactéria resistiu às condições de digestão simulada, chegando em contagens viáveis no íleo e dentro do que é preconizado pela legislação vigente (acima de 6 log de UFC/g) para que um alimento seja considerado probiótico. Ademais, esse micro-organismo pode ser utilizado como cultura de proteção, retardando o crescimento principalmente de *L. monocytogenes* em queijo *petit-suisse* caprino.

**Palavras-chaves:** micro-organismo probiótico. condições gastrointestinais. efeito antibacteriano.

SANTANA, Carolina Moreira. **GOAT CHEESE *PETIT-SUISSE* ADDED OF BACTERIA LACTIC: *in vitro* evaluation of potential probiotic.** 2015. 53 f. Completion of Course Work (Undergraduate Nutrition) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2015.

### ABSTRACT

The goat is an economic activity expanding developed throughout the country, spreading in areas that have the most different soil and climatic characteristics. However, the emerging technology used in Brazil, coupled with non-use of hygienic and sanitary control standards for goat milk and its derivatives, have been constituted as a major constraint to agriculture industry specializing in goat products, with the expansion of this sector dependence on improving the marketing structure and the application of appropriate technology to the required quality standards. Products such as cheese, yogurt and milk drinks, can be obtained from goat's milk, using simple processes and accessible to small producers, this being an alternative to the increase in consumption and value caprine origin products. Considering that the dairy sector functional foods already present as a reality, so many companies has developed in its product lines, an alternative to expansion of this market would be the production of cheeses with added lactic cultures with potential probiotic. This study will be developed in order to develop and evaluate the potential probiotic cheese petit-suisse goat during refrigerated storage. Therefore, the survival of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) when incorporated into the goat cheese *petit-suisse* and exposed to digestion conditions simulated *in vitro*. We also studied the inhibitory effect of probiotic bacteria against *L. monocytogenes* and *S. aureus* was also evaluated in this food matrix during 21 days of refrigerated storage. At the end of digestion *in vitro*, probiotic strains tested had a maintenance of the viable cell counts (6.83 log CFU/g) with respect to counts determined before exposure to conditions of the mouth (6.68 log CFU/g). As regards the inhibitory effect of the probiotic micro-organism against pathogens, it was observed that this effect was more pronounced against *L. monocytogenes* during the whole storage time, since after 21 days of storage the presence of *L. acidophilus* inhibited about 17.15% of the initial population of this pathogen. However, when the effects were evaluated against *S. aureus*, there was no protective effect effective on all days of storage, and it was observed a little inhibition on the 7th and the 14th day of storage, corresponding to 1.42% and 1, 36%, respectively. From these results, it was found that the product produced has probiotic potential, since the bacteria resist the conditions of simulated digestion, arriving in viable counts in the ileum and within what is recommended by law (above 6 log CFU/g) for a food to be considered probiotic. Furthermore, this micro-organism can be used as a protective culture, slowing the growth of *L. monocytogenes* particularly goat cheese *petit-suisse*.

**Key-words:** probiotic micro-organism. gastrointestinal conditions. antibacterial effect.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.....	30
<b>Figura 1</b> - Número de células viáveis (média $\pm$ desvio padrão) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5), quando inoculados em caldo ( $\circ, \bullet$ ) e no queijo ( $\square, \blacksquare$ ), expostos ( $\bullet, \blacksquare$ ) e não exposto ( $\circ, \square$ ) às condições simuladas do trato gastrointestinal em diferentes tempos de incubação.....	35
<b>Figura 2</b> - Taxa de inibição de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (A) e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (B) provocada por <i>L. acidophilus</i> (LA-5), em queijo <i>petit suisse</i> caprino, durante 21 dias de armazenamento a 7 °C.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

HCL – Ácido clorídrico

log – Logaritmo

M – molar

mM – milimolar

MRS – Man, Rogosa and Sharpe.

N - Normal

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio

UFC/g – unidade formadora de colônias por grama

µm – Micrómetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	15
3.2 PROBIÓTICOS.....	16
3.3 PECULIARIDADES DO <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	19
3.4 LEITE CAPRINO.....	21
3.5 QUEIJO <i>PETIT-SUISSE</i> .....	23
3.6 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES ENCONTRADOS EM QUEIJOS.....	25
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 COLETA DOS MATERIAIS.....	28
4.2 PROCESSAMENTO DO QUEIJO <i>PETIT-SUISSE</i> CAPRINO COM POTENCIAL PROBIÓTICO.....	28
4.3 TESTES <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DO QUEIJO <i>PETIT-SUISSE</i> CAPRINO.....	29
4.3.1 <b>Avaliação da sobrevivência da bactéria em condições gastrointestinais simuladas</b> .....	29
4.3.1.1 <i>Inoculação das matrizes de queijos</i> .....	29
4.3.1.2 <i>Simulação das condições gastrointestinais</i> .....	30
4.3.1.3 <i>Análises microbiológicas</i> .....	31
4.3.2 <b>Avaliação do efeito inibitório da bactéria ácido lácticas no crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i></b> .....	32
4.3.2.1 <i>Preparação dos inóculos</i> .....	32
4.3.2.2 <i>Processamento do queijo tipo petit-suisse caprino</i> .....	32
4.3.2.3 <i>Adição dos inóculos da bactéria ácido láctica e patogênicas no queijo</i> ...	32
4.3.2.4 <i>Análises microbiológicas</i> .....	33
4.3.2.5 <i>Cálculo da taxa de inibição</i> .....	34
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A incorporação de atributos de saúde adicionais aos alimentos é uma oportunidade de negócio, devido à expansão do mercado de alimentos funcionais e ao alto valor agregado desses produtos. No segmento de funcionais, a adição de probióticos é importante para inovação no desenvolvimento de novos produtos. A introdução de culturas probióticas em queijos os coloca como veículos promissores desses micro-organismos (AMARAL et al., 2009).

A exigência por alimentos com composição nutricional equilibrada e que possam oferecer benefícios adicionais à saúde é manifestada pelos consumidores atuais e, dentro deste contexto, os alimentos com potencial probiótico ganham cada vez mais a atenção do consumidor (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013; SAAD et al., 2013).

As culturas probióticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de produtos funcionais, nos quais os micro-organismos probióticos atuam como agentes tecnológicos, melhorando as características do produto tradicional, tal como a redução da pós-acidificação, e como agentes terapêuticos, promovendo efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem. Para isso, o micro-organismo utilizado deve apresentar comprovação dos efeitos benéficos e se apresentar em concentração suficiente para sua atuação durante toda a vida de prateleira do produto (MORETTI, 2009).

Por isso, tem sido sugerido que o queijo pode ser um veículo alternativo para a inoculação desses micro-organismos em números suficientes e desta forma proporcionar os efeitos terapêuticos durante toda a vida de prateleira do produto (BURNS et al., 2008; VINDEROLA et al., 2000). Comparando aos leites fermentados, os queijos apresentam características físico-químicas que favorecem a manutenção da viabilidade dos probióticos: pH mais alto, menor conteúdo de oxigênio e maior estabilidade do meio na estocagem (BOYLSTON et al., 2004). A legislação brasileira reconhece vários probióticos e, entre eles, o *L. acidophilus* (BRASIL, 2008).

A viabilidade e a atividade das bactérias probióticas são considerações importantes, visto que devem sobreviver no alimento durante sua vida de prateleira e durante o trânsito gastrointestinal, sob a ação das condições ácidas do estômago e resistir à degradação pelas enzimas hidrolíticas e sais biliares (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Desta forma, as propriedades funcionais dos probióticos podem ser influenciadas pela matriz alimentar utilizada como transportadora dessas cepas, a qual poderá trazer um efeito protetor para esses micro-organismos até que os mesmos possam atingir o trato intestinal

em contagens viáveis e, assim, mediar os seus efeitos benéficos para o consumidor (OUWEHAND et al., 2001; RANADHEERA et al., 2010).

A atividade antimicrobiana é uma das características mais marcantes de bactérias probióticas, por isso a incorporação de cepas probióticas em queijos poderia impedir (ou, pelo menos, retardar) o crescimento ou sobrevivência de bactérias patogênicas e a deterioração desses alimentos por bactérias e fungos, atuando como culturas protetoras, estendendo seu prazo de validade e aumentando a segurança alimentar. Essa atividade antimicrobiana das bactérias ácido-láticas probióticas deve-se, principalmente, à produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, gordura e metabólitos do ácido amino (TODOROV; DICKS, 2006).

O desenvolvimento de queijo potencialmente probiótico a partir de leite de cabra justifica-se em função do potencial de mercado, do alto valor agregado atribuído aos alimentos funcionais e da possibilidade de inserção de produtos lácteos caprinos nesse segmento (AMARAL et al., 2009).

Neste contexto, este estudo representa uma possibilidade de obtenção de informações ainda ausentes na literatura científica, no que diz respeito à tecnologia de fabricação de queijo tipo *petit-suisse* caprino adicionado de cultura láctica com potencial probiótico e ao papel protetor do queijo *petit-suisse* na sobrevivência da bactéria *Lactobacillus acidophilus* em condições similares àsquelas encontradas no trato gastrointestinal de humanos, bem como do efeito inibitório desta cepa contra bactérias patogênicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar e avaliar o potencial probiótico de queijo *petit-suisse* caprino adicionado de *Lactobacillus acidophilus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar queijo *petit-suisse* caprino adicionado de *L. acidophilus*;
- ✓ Analisar a sobrevivência *in vitro* desta bactéria adicionada ao queijo *petit-suisse* caprino quando exposta às condições simuladas do trato gastrointestinal;
- ✓ Avaliar o efeito inibitório da bactéria ácido láctica ensaiada, adicionada isoladamente ao queijo *petit-suisse* caprino, frente às bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, durante armazenamento refrigerado.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Atualmente, a dieta é considerada o fator mais importante para a saúde, e o desenvolvimento de alimentos que promovam a saúde e o bem-estar é uma das prioridades de pesquisa para as indústrias alimentícias. Isso favorece o consumo de alimentos enriquecidos com compostos ativos fisiologicamente (BETORET et al., 2003; JANER et al., 2004).

Naturalmente, todos os alimentos são funcionais, uma vez que nos proporcionam sabor, aroma e valor nutritivo. Entretanto, nas últimas décadas, o termo funcional está sendo aplicado a alimentos com uma característica diferente, a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além das qualidades nutricionais básicas encontradas. Tais alimentos também são vistos como promotores de saúde e podem estar associados à redução ao risco a certas doenças (VO; KIM, 2013).

Em meados dos anos 80, surgiu no Japão o termo “alimentos funcionais”, como resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (ARAYA; LUTZ, 2003).

Recentemente os alimentos funcionais também são conhecidos por outros nomes, como nutracêuticos, alimentos terapêuticos e alimentos medicinais. Tais alimentos podem conter um ou até mesmo uma combinação de componentes que promovem efeitos fisiológicos desejáveis no corpo humano (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Alimentos funcionais são aqueles que, além do seu valor nutritivo intrínseco, contêm um ou mais compostos nutritivos ou não, que apresentam funções bioquímicas e fisiológicas benéficas à saúde humana. Esses alimentos incluem produtos integrais, fortificados, enriquecidos ou melhorados, que têm efeitos potencialmente benéficos na saúde, quando consumidos regularmente como parte de uma dieta variada e em níveis efetivos (COSTA; ROSA, 2006).

Os alimentos funcionais fornecem uma nutrição básica e satisfatoriamente geram benefícios à saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo-se lembrar que esses alimentos têm o objetivo de promover saúde e não a cura de doenças (BECKER, 2009; SANTOS et al., 2011a).

Alimento funcional é definido pela Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, como sendo "aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (RDC nº 18/99) (BRASIL, 1999a).

Os alimentos funcionais constituem hoje prioridade de pesquisa em todo mundo com a finalidade de elucidar as propriedades e os efeitos que estes produtos podem apresentar na promoção da saúde. Estes insumos são classificados variando quanto a sua fonte de origem, sendo vegetal ou animal, e quanto aos benefícios causados pelos princípios ativos adicionados aos alimentos para quem os consomem. Podem atuar em seis áreas do nosso organismo: no sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento, na diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA, 2003).

O caráter funcional pode ser atribuído a uma qualidade inerente à matéria prima ou uma característica implementada através de tecnologias de processamento inovadoras ou a adição de ingredientes promotores da saúde, à matriz alimentar, sendo que as indústrias sempre buscaram ofertar novos produtos com foco neste nicho emergente de mercado (BISTROM; NORDSTROM, 2002). No setor lácteo, os alimentos funcionais já são uma realidade e muitas empresas de alimentos desenvolvem suas linhas de produtos tendo a promoção da saúde como principal objetivo (BELCHIOR, 2004).

A classificação de um alimento funcional pode ser dada de acordo com o alimento em si ou conforme a presença de componentes bioativos presentes neles, como exemplo probiótico (KOMATSU et al., 2008).

### 3.2 PROBIÓTICOS

Entende-se por probióticos microrganismos vivos capazes de alcançar o trato gastrintestinal e alterar a composição da microbiota, produzindo efeitos benéficos à saúde quando consumidos em quantidades adequadas. Esses efeitos estão direta e exclusivamente relacionados ao tipo da cepa utilizada (AGOSTONI et al., 2004).

Os probióticos eram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de microrganismo vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o

balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Em um intestino adulto saudável, a microbiota predominante se compõe de microrganismos promotores da saúde, em sua maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os *Lactobacillus* geralmente citados como probióticos são: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbreuckii subsp. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. cellibiosus*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. reuteri*. As espécies de *Bifidobacteria* com atividade probiótica são: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum* e *B. animalis* (MORAES; COLLA, 2006). Os lactobacilos e bifidobactérias colonizam o intestino, de preferência o íleo terminal e o cólon.

Vários fatores externos podem interferir na microbiota normal do nosso intestino, como a dieta, o uso de antibióticos, stress, fumo, tratamentos quimioterápicos e radioterapia, além do envelhecimento (SANTOS et al., 2008).

Os micro-organismos para serem considerados probióticos devem ser reconhecidos internacionalmente, resistir à passagem no trato gastrointestinal para seguirem até o intestino e promoverem seus benefícios. Para que isso aconteça devem resistir ao suco gástrico e sais biliares e aderirem ao muco ou epitélio intestinal e ter viabilidade até o consumo final, além de comprovação *in vivo* e *in vitro* por doses reconhecidas (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; ZUCCOTTI et al., 2008).

As bactérias aprovadas para uso em produtos probióticos são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus*, *L. defensis*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (Brasil, 2005). Ainda segundo Brasil (2005) a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção diária, a legislação ainda permite valor abaixo deste, desde que se comprove a eficácia do micro-organismo no produto e na concentração inferior.

O consumo de quantidades adequadas dos microrganismos probióticos desejadas nos bioprodutos ( $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/100g de produto) são suficientes para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g) *in vivo* (CHARTERIS et al., 1998). Para ter a eficácia de um alimento probiótico o número dessas bactérias deve estar viável, ativo e abundante até o final do prazo de validade. (SAAD, 2006; ZHAO et al., 2008).

Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo

gastrintestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese (COPPOLA; TURNES, 2004; DILNAWAZ et al., 2011).

São características importantes para a seleção de um probiótico: a capacidade de permanecer viável e manter a sua atividade no ecossistema gastrointestinal do hospedeiro, a capacidade de se manter viável durante o processamento e a estocagem do produto e ser completamente seguro para o consumo humano (LEE; SALMINEN, 1995; GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004). Cepas que exercem seu efeito benéfico nos intestinos devem ser capazes de tolerar os diversos fatores bióticos e abióticos interferentes, como fatores físico-químicos: pH, potencial de oxidorredução, secreção biliar, disponibilidade de nutrientes e atividade imunológica local (O'SULLIVAN et al., 1992).

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (SAAD, 2006).

Assim, os micro-organismos probióticos podem apresentar atividade antimicrobiana e serem utilizados como alternativas para prevenir ou inibir o crescimento de patógenos e a deterioração dos alimentos por bactérias e fungos (AHMADOVA et al., 2013; THARMARA; SHAH, 2009).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da concentração dos ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Outros benefícios fisiológicos de cepas probióticas são: regulação do fluxo intestinal, redução do colesterol, melhora da absorção de ferro e cálcio, a redução de compostos tóxicos no organismo, a melhoria da saúde urogenital, redução dos produtos

catabólicos eliminados pelos rins e fígado, prevenção da arteriosclerose (redução de colesterol), prevenção da osteoporose, melhora do desenvolvimento (crescimento), a melhora do bem-estar, síntese de nutrientes (ácido fólico, niacina, riboflavina, vitaminas B6 e B12), aumento da biodisponibilidade de nutrientes, prevenção de infecções do trato intestinal (induzido por bactérias ou vírus, *Candida enterite*, *Helicobacter pylori* úlcera/neoplasia), regulação da motilidade do intestino (constipação, síndrome do intestino irritável), diminuição da diarreia induzida por quimioterapia antituberculose e melhora da colite (GRANATO; BRANCO; CRUZ, 2010).

### 3.3 PECULIARIDADES DO *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus* foi isolado pela primeira vez por Moro, em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno. Este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (GOMES; MALCATA, 1999).

Os lactobacilos constituem um importante grupo de bactérias ácido lácticas, estando amplamente difundidos na natureza. O gênero *Lactobacillus* é, certamente, o mais amplo dos gêneros incluídos dentro deste grupo, sendo que diversas espécies já foram relatadas por vários autores como produtoras de substâncias antimicrobianas (RACCACH; McGRATH; DAFTARIAN, 1989; EL-ZINEY et al., 1999; ZAMFIR et al., 2000; AHMADOVA et al., 2013). O gênero compreende 80 espécies aproximadamente reconhecidas, sendo as mais utilizadas os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*, se destacando o *Lactobacillus acidophilus* (VALERIANO et al., 2009).

Diversos estudos mostram que *Lactobacillus acidophilus* seria o micro-organismo mais indicado na bacterioterapia por possuir a capacidade de se aderir ao epitélio intestinal e, também, por ser capaz de tolerar a acidez do suco gástrico, quando comparado a outras espécies de *Lactobacillus*. O *L. acidophilus* é um bacilo Gram-positivo com extremidades arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, com tamanho típico de 0,6-0,9 µm de diâmetro e 1,5-6,0 µm de comprimento (GARCIA et al., 2006). Estes micro-organismos são caracterizados como não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, possuindo formato bacilar ou cocobacilar podendo ser anaeróbio ou aerotolerantes (BUGLIONE et al., 2008).

Presente na parede do intestino delgado e na parede da vagina, essas bactérias saudáveis proporcionam proteção contra a entrada e proliferação de micro-organismos

patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Clostridium* (THAMER; PENNA, 2005). Ainda segundo Thamer e Penna (2005), essa proteção é realizada através de vários mecanismos, como exemplo pela quebra dos alimentos, esse processo faz com que os *Lactobacillus acidophilus* produza ácido láctico, peróxido de hidrogênio e algumas outras substâncias que dificultam a colonização de patógenos no meio.

É considerado um micro-organismo probiótico em razão dos benefícios relacionados ao consumo e outras características, a exemplo da resistência aos ácidos e à bile, sendo capaz de sobreviver ao trânsito do trato gastrointestinal após serem ingeridos (GARCIA et al., 2006; MACEDO et al., 2008).

Alguns pesquisadores relatam que cepas de *L. acidophilus* apresentam atividade antimicrobiana sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem apresentar atividade sobre outros lactobacilos e bifidobactérias (MITAL; GARG, 1995; BERNET-CAMARD et al., 1997).

Segundo Badaró et al. (2009) o consumo de produtos contendo cepa de *Lactobacillus acidophilus* é indicado por trazer algumas vantagens como: auxiliar a digestão e suprimir bactérias causadoras de doenças; repovoar e fixar a flora intestinal e vaginal destruída por antibióticos ou doenças; no alívio da síndrome do intestino irritável; na prevenção e tratamento de diarreias, inclusive por rotavírus; prevenindo ou reduzindo a ocorrência de infecções vaginais causadas por leveduras patogênicas, incluindo a *Candida albicans*; facilitar o aumento da absorção de minerais; facilitar a síntese de ácidos graxos de cadeia curta e na ativação do sistema imune.

Outra vantagem desse microrganismo é a alta quantidade de enzima lactase que ele produz, fazendo com que essa enzima fracione as moléculas do açúcar presente no leite (lactose) em açúcares mais simples, tornando mais fáceis de serem digeridos, ajudando assim aquelas pessoas com intolerância a lactose e que não produzem essa enzima (SANTOS, 2011a); e em razão dos benefícios relacionados ao consumo, essa cepa está sendo muito utilizada na indústria de laticínios.

Além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde que proporcionam, as culturas probióticas podem também contribuir para melhorar o sabor do produto final, possuindo a vantagem de promover acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento (GOMES, MALCATA, 1999), o que justifica a sua utilização na fermentação de diversas matrizes alimentares, a exemplo do leite, para obtenção de fermentados lácteos.

### 3.4 LEITE CAPRINO

A Região Nordeste contribui com 90% da produção nacional de leite caprino, entretanto, observa-se uma baixa produtividade dos rebanhos, causada pela falta de disponibilidade de tecnologias, aliada aos produtos de baixa qualidade e a desarticulação da cadeia produtiva, constituindo-se em fatores de entrave na caprinocultura desta região. Com uma produção diária de 14 mil litros, a Paraíba é o maior produtor de leite de cabra do País (FAOSTAT, 2013; AZEVEDO, 2012).

Dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) estimam que o rebanho caprino mundial em 2011 era na cifra de 876 milhões de cabeças, com 1,1% deste efetivo distribuído no Brasil. A região Nordeste contribui com 94% do rebanho brasileiro, onde se aplica, predominantemente, o sistema de criação extensivo. Embora este número seja expressivo, a caprinocultura leiteira ainda apresenta níveis reduzidos de desempenho, principalmente quando é comparada com outros países da Europa, que detêm rebanhos menores que o brasileiro, mas apresentam consideráveis produções leiteiras (FAOSTAT, 2013).

A exploração dos caprinos para leite tem crescido, porque além do leite ser considerado um produto de alto valor nutritivo, os caprinos têm a capacidade de se adaptar a condições criatórias variáveis, podendo proporcionar a famílias de baixa renda familiar, e a população em geral, uma melhoria do nível nutricional da dieta (FIGUEIREDO, 1990; MEDEIROS, 1994; KNIGHTS; GARCIA, 1997).

O leite caprino e seus produtos representam um nicho promissor para a indústria láctea, devido principalmente aos benefícios nutricionais e suas propriedades para a saúde. Os derivados do leite de cabra são produtos de elevado valor agregado e características de sabor e aroma particulares, evidenciando oportunidades de diversificar e inovar o mercado de leite atendendo a novas demandas de produtos diferenciados e com propriedades de hipoalergenicidade (RODRIGUEZ et al., 2008; VARGAS et al., 2008).

Dentre os vários tipos de leite, o caprino destaca-se por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas, caseína e albumina, necessárias à constituição dos tecidos e sangue; gordura insaturada, que contribui para circulação sanguínea; sais minerais, necessários para a formação do esqueleto; e ainda, vitaminas e fermentos lácticos, sendo estes últimos favoráveis à digestão e capazes de exercer ação de defesa frente à ação de bactérias patogênicas a nível intestinal (PARK et al., 2007; HAENLEIN, 2004).

A legislação brasileira define leite de cabra como “produto normal, fresco e integral, obtido da ordenha completa e ininterrupta de animais sadios, bem alimentados e em repouso” (BRASIL, 1999b).

O leite de cabra é um líquido branco, puro, de odor e sabor especiais e agradáveis. Não possui nenhum cheiro típico ou desagradável, mas se apresentar odor é devido às más condições de higiene. O mau cheiro, denominado hírcino, é transmitido pelo bode quando está perto das cabras em lactação, impregnando-as, além de transmiti-lo diretamente ao leite (QUADROS, 2008). Entretanto, o *flavour* caprino acentuado muitas vezes indesejável, apresenta-se como um dos fatores de recusa (QUEIROGA et al., 2003).

Apresentando alto valor nutritivo e qualidade dietética, é um alimento que apresenta elementos necessários à nutrição humana, como: açúcares, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais (QUADROS, 2008).

O leite de cabra destaca-se por apresentar elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas; caseína e albumina; gordura insaturada; sais minerais e vitaminas; em soma a presença de fermentos lácticos, os quais apresentam propriedades favoráveis à digestão, bem como para defesa do trato gastrointestinal contra a ação de bactérias patogênicas (HAENLEIN, 2004).

Contém percentual mais elevado de ácidos graxos de cadeia curta e média, facilitando a digestibilidade e favorecendo o esvaziamento gástrico e, em consequência, reduz a incidência de aparecimento de refluxo gastroesofágico. Os teores de vitamina no leite de cabra estão próximos aos do leite de vaca, exceto pelas vitaminas B6, B12 e ácido fólico, as quais estão diminuídas no leite de cabra; os teores de vitamina A estão aumentados e, além disso, as cabras fisiologicamente convertem todo o caroteno em vitamina A, conferindo ao leite a coloração esbranquiçada, pela ausência deste pigmento. Os níveis de vitamina C e D do leite são baixos e aproximadamente os mesmos para o leite de cabra e de vaca. Quanto aos minerais, o leite de cabra apresenta maior quantidade de cálcio, potássio, magnésio, fósforo, cloro e manganês, porém, menor quantidade de sódio, ferro, zinco, enxofre e molibdênio, quando comparado ao leite de vaca (HAENLEIN; CACCESE, 1984)

Segundo Haenlein e Caccese (1984) “o leite de cabra é rico em ácidos graxos com cadeias curtas, tais como o cáprico e caprílico. Sendo esses ácidos graxos comumente usados em tratamentos de pessoas com problemas de má absorção, pois têm habilidade

única de prover energia, além de inibir e limitar a deposição de colesterol nos tecidos e dissolver as placas de colesterol”.

O leite de cabra tem sido um substituto satisfatório nos casos de crianças e adultos alérgicos às proteínas do leite de vaca, que são a caseína alfa-s1, lactoalbumina e beta globulina (estas últimas ditas proteínas do soro ou séricas). A caseína do leite de cabra tem uma estrutura diferente, possui mais caseína- $\beta$ , caseína alfa-s2 e pouca quantidade de caseína alfa-s1. Isto explica a boa tolerância ao leite de cabra pelas pessoas que são sensíveis ao leite de vaca. É de fácil digestão porque suas gorduras são moléculas micro, ao contrário do leite de vaca que possui moléculas macro (QUADROS, 2008).

A partir do leite caprino podem ser obtidos produtos como queijos, iogurtes e bebidas lácteas, utilizando-se de processos simples e acessíveis aos pequenos produtores, sendo essa uma alternativa para o aumento no consumo de produtos de origem caprina, e para a agregação de valor a tais produtos (SANTOS et al., 2011b).

O leite caprino e seus produtos representam um nicho promissor para a indústria láctea, devido principalmente aos benefícios nutricionais e suas propriedades para a saúde. Os derivados do leite de cabra são produtos de elevado valor agregado e características de sabor e aroma particulares, evidenciando oportunidades de diversificar e inovar o mercado de leite atendendo a novas demandas de produtos diferenciados e com propriedades de hipoalergenicidade (RODRIGUEZ et al., 2008; VARGAS et al., 2008).

### 3.5 QUEIJO *PETIT-SUISSE*

A maneira mais simples de definir o queijo talvez seja como o produto fresco ou maturado, obtido por separação do soro depois da coagulação do leite. O queijo é a coalhada que se forma com a coagulação do leite de alguns mamíferos pela adição de coalho ou enzimas coagulantes e/ou pelo ácido láctico produzido pela atividade de determinados microrganismos presentes normalmente no leite ou adicionados intencionalmente (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Do ponto de vista da fabricação de queijos, o leite de cabra, comparado ao leite de vaca, apresenta algumas características especiais como, por exemplo, possui glóbulos de gordura menores que promovem um desnate natural mais lento e com melhor absorção na mucosa intestinal. O leite de cabra não tem  $\beta$ -caroteno, daí a cor branca de seus derivados; apresenta duas vezes mais ácidos graxos de cadeia curta, o que confere o pronunciado sabor e aroma nos queijos. Em geral possui menor teor de proteínas (em

média 2,82% contra 3,20%), sendo menor também a quantidade de caseínas (2,33% contra 2,70%) e maior a de substâncias nitrogenadas não protéicas (cerca de 0,27% contra 0,16%) e ainda possui ligeiramente maior teor de cálcio (1,35 g/l contra 1,25 g/l). As micelas protéicas são menos hidratadas e o maior teor de soro proteico e de cálcio confere ao leite de cabra menor estabilidade térmica (CIÊNCIA DO LEITE, 2014).

Dentre os vários tipos de queijo, o queijo *petit-suisse* é um queijo magro feito com leite, adicionado de creme. Após a drenagem do soro, a massa concentrada é resfriada, devendo apresentar extrato seco total em torno de 16%, sendo então resfriada. A adição de açúcar deve ser feita nas mesmas proporções da quantidade de gordura do creme a ser padronizado (ALBUQUERQUE, 1986).

O queijo *petit-suisse*, desenvolvido por Charles Chervais em 1850, é produzido com leite desnatado e adicionado de creme, de consistência cremosa, e sua massa é obtida pelo processo de coagulação mista, podendo ser adicionado de condimentos doces ou salgados (GOMES; MALCATA, 1999).

Entende-se por queijo "*petit-suisse*", o queijo fresco, não maturado, obtido por coagulação do leite com coalho e/ou de enzimas específicas e/ou de bactérias específicas, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2001a).

É um produto de alto valor nutricional, destacando-se o elevado teor de proteínas lácteas, bem como seu grau acentuado de digestão e assimilação pelo organismo humano, além de ser rico em cálcio, fósforo e vitaminas lipossolúveis (GAMBELLI, 1999).

A produção anual brasileira de queijo *petit-suisse* aumentou de 14.000 toneladas em 1991 para 22.932 toneladas em 2004 e foi estimada em 24.000 toneladas em 2005 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2010).

No Brasil, este queijo é fabricado industrialmente por centrifugação da coalhada, para a separação do soro, obtendo-se o queijo "quark", que é utilizado como base para o queijo *petit-suisse* (VEIGA et al., 2000).

O queijo "quark" é uma massa branca desnatada, macia e pastosa, não maturada, com sabor levemente ácido, que pode ser utilizada para a fabricação de diversos tipos de queijos, dependendo dos ingredientes que forem adicionados. Por exemplo, pode-se adicionar sal e condimentos (bacon, azeitona, salsa, etc.), para a produção de queijos condimentados, ou açúcar e base de frutas, para a produção de queijo *petit-suisse* (MORGADO; BRANDÃO, 1998).

Tendo em vista o processo de produção de queijo fresco, um queijo não maturado e que é armazenado em temperatura de refrigeração, tendo vida de prateleira bastante

restrita, esse tipo de queijo é um veículo promissor para bactérias probióticas. A sobrevivência de bactérias probióticas em produtos como os queijos frescos é maior quando comparado aos queijos maturados (HELLER et al., 2003).

Os queijos possuem certas características que os tornam um produto alternativo para incorporar bactérias probióticas. A matriz do queijo, a capacidade tamponante e o teor de gordura podem oferecer proteção às células durante a passagem pelo trato gastrointestinal (SAAD, 2006).

O queijo *petit-suisse*, pode ser consumido como sobremesa, dirigido principalmente ao público infantil, podendo também ser consumido por adultos, cuja aceitação tem sido bem apreciada. Entretanto, apesar de sua boa aceitação seu consumo no Brasil ainda é pequeno se comparado aos de outros países (VEIGA et al., 2000).

Além do queijo *petit-suisse* possuir grande aceitação pelo público em geral e por apresentar excelente valor nutritivo, é considerado um veículo em potencial para o consumo de probióticos.

### 3.6 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES ENCONTRADOS EM QUEIJOS

Os queijos, de um modo geral, podem conter micro-organismos desejáveis e indesejáveis. Os desejáveis são aqueles que podem contribuir positivamente para o desenvolvimento das características organolépticas do produto, podendo desta forma, exercer um efeito benéfico no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo por meio de sua atividade metabólica. Entretanto, a presença de alguns micro-organismos indesejáveis podem ocorrer. São os assim chamados deteriorantes e/ou patogênicos os quais vão exercer um efeito maléfico na qualidade sensorial do produto, podendo, em alguns casos, provocar doenças (PEREIRA, 2007).

A maioria dos alimentos, principalmente de origem animal, como leite e seus produtos derivados, está sujeita à contaminação por micro-organismos capazes de produzir doenças no ser humano. Assim, o queijo assume destacada relevância, já que se trata de um produto derivado do leite e, principalmente, quando fabricado a partir de leite não pasteurizado, pode sofrer algum tipo de contaminação por bactérias patogênicas e enterotoxigênicas. Isto pode ocorrer devido a uma deficiência na higiene, durante o processo de obtenção, fabricação e manipulação dos mesmos (ALMEIDA; FRANCO; ISEPON, 2003 apud MARQUES et al., 2006), o que pode tornar este produto susceptível a estar contaminado com micro-organismos

patogênicos, e dentre estes destaca-se a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e microrganismos do grupo coliformes (DUARTE, 1999).

A *Listeria monocytogenes* é um importante patógeno veiculado por alimentos, ocasionando surtos de listeriose humana, com altos índices de mortalidade (McLAUHLIN, 1996). De acordo com Lake et al. (2002), esse patógeno pode permanecer ativo durante um longo tempo em ambientes secos, possuindo habilidade para crescer em temperatura de refrigeração (4 °C) e em pH em torno de 7.0. Esta bactéria cresce muito bem em condições microaerófilas, assim como aerobicamente e anaerobicamente, sendo rapidamente inativada a 70 °C e pH menores que 4,4.

Considerando a necessidade de aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção da saúde da população e a qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, a Resolução – RDC nº 12, de 02/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, estabelece ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra como padrão microbiológico sanitário para queijo de umidade muito alta (BRASIL, 2001b), como é o caso do queijo *petit-suisse*.

Outro agente responsável por casos de toxinfecções alimentares é o *S. aureus*, comumente detectado em queijos. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir deste foco, atingem tanto a epiderme, como feridas e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem. Os portadores nasais e os manipuladores de alimentos com mãos e braços que apresentem feridas infectadas com *S. aureus* são importantes fontes de contaminação para o alimento. Além do homem, a maioria dos animais domésticos também é portadora ou se apresenta contaminada pela bactéria. Um exemplo típico é a mastite estafilocócica, que pode infectar o leite e causar intoxicação, caso seja consumido ou utilizado no preparo de queijos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Alguns estudos evidenciaram a contaminação de diferentes tipos de queijos por esses micro-organismos, entre eles destacam-se o estudo Sousa et al. (2000) que ao analisarem 30 amostras de queijo de coalho, comercializados na cidade de João Pessoa, observaram que 50% estavam contaminadas com espécies de *Listeria*. Nos estudos de Rodrigues et al. (1995), Cerqueira et al. (1995) e por Sabioni et al. (1993), foi observado que, respectivamente, 100,0%, 60,0% e 21,5% das amostras de queijo tipo Minas “frescal” de produção artesanal analisadas apresentaram contagens de *S. aureus* acima do referido padrão legal.

Para Franco e Langraf (2005), uma das principais preocupações do microbiologista de alimentos, relacionando-se ao controle do desenvolvimento microbiano, visa à eliminação dos

riscos à saúde do consumidor, bem como prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos. O ideal é que os micro-organismos não tenham acesso aos alimentos, excetuando-se, evidentemente, aqueles obtidos através de processos de fermentação. Entretanto, uma vez que tal fato é praticamente impossível, é necessária a adoção de medidas para controlar seu desenvolvimento.

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma interação de fatores que envolvem o patógeno em si e o alimento que o veiculará, podendo atuar amplificando ou atenuando a contaminação e os níveis de multiplicação destes micro-organismos. Entre estes fatores, pode-se citar o processamento, a distribuição, o consumo e a imunidade da população. Assim, para garantir segurança microbiológica dos alimentos, deve-se atuar em todas as fases, minimizando os níveis iniciais de contaminação, prevenindo ou limitando o potencial de multiplicação e eliminando os micro-organismos indesejáveis (NERO, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande.

### 4.1 COLETA DOS MATERIAIS

O leite de cabra foi adquirido de cabras da raça *Toggenburg* de um pequeno produtor da cidade de Nova Floresta/PB, sendo transportado em recipiente previamente estéril, isotérmico e reservado unicamente para seu transporte até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, onde foi elaborado o queijo *petit-suisse* e foi armazenado sob refrigeração por no máximo 1 dia até o momento do processamento em pequena escala dos queijos.

A cultura láctica constituída pelo *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), o ácido láctico e o cloreto de cálcio que foram utilizados na produção dos queijos *petit-suisse* foram disponibilizados pela Christian Hansen<sup>®</sup> (Valinhos, Minas Gerais, Brasil). As cepas de bactérias patogênicas, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538, foram adquiridas da Coleção de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

Os demais ingredientes como o coalho, creme de leite tradicional esterilizado, polpa de morango integral congelada sem conservantes, açúcar refinado e aroma natural idêntico ao de morango foram adquiridos em redes de supermercados da cidade de Cuité/PB.

### 4.2 PROCESSAMENTO DO QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO COM POTENCIAL PROBIÓTICO

Inicialmente foi elaborada a massa-base do queijo Quark, a partir do qual foi elaborado o queijo *petit-suisse*. Para tanto, após a pasteurização do leite a 65 °C por 30 minutos, o ácido láctico (0,25 mL/L) foi adicionado. A cultura probiótica foi adicionada a uma concentração de 0,01% (100 mg/L), seguida de uma nova homogeneização do leite e adição do cloreto de cálcio (0,4 mL/L). O coalho (0,9 mL/L), previamente diluído na mesma quantidade de água filtrada, foi adicionado quando o leite atingiu pH entre 6,3 a 6,5, seguido de homogeneização. Após a coagulação da massa (pH entre 5,6 e 5,8), a

coalhada foi cortada. Em seguida, a massa foi transferida para uma forma de queijo contendo um dessorador para a realização da drenagem do soro por gravidade.

O queijo *petit-suisse* foi obtido a partir de homogeneização em liquidificador do queijo quark com os seguintes ingredientes: creme de leite tradicional esterilizado (Nestlé do Brasil Ltda., Araçatuba, Brasil), polpa de morango (Cooperativa, Cuité, Brasil), açúcar refinado União (Coopersucar-União, Limeira, Brasil) e corante natural (Emultina Selecta<sup>®</sup>). Finalizada a homogeneização, acondicionou-se o produto em um recipiente de vidro com tampa, estéril, e armazenou-se sob temperatura de refrigeração, até o momento das análises.

#### 4.3 TESTES *IN VITRO* DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DO QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO

Esses testes consistiram na avaliação do efeito protetor do queijo *petit-suisse* caprino sobre a sobrevivência da bactéria láctica probiótica adicionada ao mesmo, quando exposta às condições simuladas do trato gastrointestinal e avaliação do efeito inibitório desta cultura adicionada ao queijo contra as bactérias patogênicas contaminantes *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

##### 4.3.1 Avaliação da sobrevivência da bactéria em condições gastrointestinais simuladas

Após processamento do queijo conforme metodologia descrita em 4.2, e armazenamento por 7 dias sob temperatura de refrigeração, as análises se procederam da seguinte forma:

###### 4.3.1.1 Inoculação das matrizes de queijos

A bactéria ácido láctica probiótica foi estudada em um conjunto de três amostras rotuladas como C1, C2 e S1. O C1 foi o queijo controle, que foi inoculado com a cepa testada, mas não foi exposto às condições simuladas gastrointestinais; C2 foi um queijo controle que não foi inoculado com a bactéria, mas foi exposto às condições simuladas gastrointestinais (usado para realizar assepticamente os ajustamentos de pH nas etapas sequenciais da digestão simulada). S1 foi o queijo inoculado e exposto às condições simuladas gastrointestinais. Todas as amostras acima mencionadas foram preparadas em

frascos estéreis de 50 mL. Nestes recipientes, os queijos com a bactéria testada foram distribuídos em quantidades de 25 g cada. Para avaliar o real efeito protetor do queijo *petit-suisse*, realizou-se os mesmos procedimentos descritos acima utilizando apenas o caldo MRS suplementado com cisteína a 5% e adicionado da bactéria probiótica, como controle do experimento.

#### 4.3.1.2 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal utilizada está descrita no Quadro 1, incluindo os compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas. As agitações foram utilizadas para simular os movimentos peristálticos.

**Quadro 1** - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30
Íleo	-----	45	6,5	60

Fonte: Madureira et al. (2011).

A mastigação foi simulada de acordo com Hold et al. (1995) e Choi et al. (2007), utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de 1- $\alpha$ -amilase diluída em solução de CaCl<sub>2</sub> a 1 mM, onde o pH foi ajustado para 6,9 utilizando solução de NaHCO<sub>3</sub> a 1 mM. Esta solução foi adicionada em 25 g das amostras a uma taxa de 0,6 mL/min, durante 2 minutos. Na etapa que simula as condições do esôfago-estômago foi adicionada solução de pepsina a uma taxa de 0,05 mL/mL, durante 90 minutos. A solução de pepsina

foi preparada com HCl a 0,1 N numa proporção de 25 mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1 M (MAINVILLE et al., 2005). As condições do duodeno foram simuladas utilizando 2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares, diluídos em solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 M. Esta solução foi adicionada no início da etapa a uma taxa de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO, 2007). Finalmente, a etapa do íleo foi provocada por um aumento do pH para 6,5 utilizando solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 M. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou (como acontece durante uma digestão real).

Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, usando membrana filtrante de 0,22 µm (Milipore, Billerica MA, USA) antes de serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Uma câmara de incubação a 37 °C com agitação mecânica que foi usada para simular a temperatura do corpo humano e os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo.

#### 4.3.1.3 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis da bactéria láctica adicionada aos queijos e caldo MRS expostos e não expostos a cada condição gastrointestinal simulada foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram semeadas, posteriormente, conforme método proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). O *L. acidophilus* foi semeado em placas com ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubado sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama/mL de queijo (log de UFC/g) e o caldo MRS (log de UFC/mL). O pH das amostras foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrintestinais com um medidor de pH (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90 mL/100 mL).

### 4.3.2 Avaliação do efeito inibitório da bactéria ácido lácticas no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*

#### 4.3.2.1 Preparação dos inóculos

Para preparar os inóculos que foram adicionados ao queijo, o *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) foi primeiramente cultivado em caldo MRS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), e incubado a 37 °C, durante 48 h. Os meios preparados para esta cepa foram suplementados com 0,05% (w/v) de HCl-cisteína (Sigma-Aldrich). *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram cultivados em caldo BHI (Sigma-Aldrich) para obtenção de pré-inóculo e novamente cultivados em caldo BHI (1:9 v/v) e incubados a 37 °C, durante 24 h. Para verificar os níveis desejados de inóculo contendo a bactéria ácido láctica probiótica (8 a 10 log UFC/mL) e bactérias patogênicas (6 a 7 log UFC/mL), diluições em série foram preparadas com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma-Aldrich)]. Para as contagens de células viáveis da bactéria probiótica, esta diluição foi subsequentemente plaqueada, utilizando-se o método de Miles, Misra e Irwin método (1938), em ágar MRS (Sigma-Aldrich) e incubadas sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como log de UFC/g. Para as contagens de células viáveis das bactérias patogênicas estas diluições foram subsequentemente semeadas em placas com ágar BHI (Sigma-Aldrich) e incubadas sob condições aeróbicas, a 37 °C/24 h. Os resultados foram expressos como o log de UFC/g.

#### 4.3.2.2 Processamento do queijo tipo *petit-suisse caprino*

Seguiu-se a metodologia mencionada em 4.2, com exceção da adição da cultura ácido láctica probiótica.

#### 4.3.2.3 Adição dos inóculos da bactéria ácido láctica e patogênicas no queijo

Para a bactéria probiótica testada, um nível de inóculo de bactérias contaminantes foi testado. Foi elaborado um queijo controle positivo, adicionado apenas do inóculo contendo as bactérias patogênicas isoladas, assim como um queijo controle negativo, contendo apenas a bactéria ácido láctica isolada, totalizando 3 amostras controles. A bactéria probiótica foi

inoculada numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 8 a 10 log UFC/mL) para cada 25 g de queijo. Já as bactérias contaminantes foram inoculadas numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 6 a 7 log UFC/mL) para cada 25 g de queijo. A amostra de queijo experimental consistiu no queijo adicionado das culturas mistas, contendo 1 mL de inóculo de bactéria probiótica isolada e 1 ml do inóculo de bactérias contaminantes isoladas, com os mesmos níveis de inóculos mencionados acima, resultando em 2 amostras (1 cepa probiótica x 2 cepas patogênicas).

Todas as amostras de queijo inoculadas foram agitadas com um misturador elétrico (Kenwood, UK) durante 5 min. e igualmente distribuídas assepticamente em frascos estéreis de 50 mL e armazenadas a 7 °C durante 21 dias, correspondendo a um total de 20 amostras (5 amostras x 4 tempos de armazenamento). Cada amostra foi submetida a contagem de células viáveis de bactérias probióticas e contaminantes no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado.

#### 4.3.2.4 Análises microbiológicas

As contagens de células viáveis da bactéria ácido láctica probiótica e bactérias patogênicas nas matrizes de queijos foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram plaqueadas em seguida, usando o método de Miles, Misra e Irwin (1938), para a contagem da bactéria ácido láctica probiótica. O *L. acidophilus* foi semeado em placas com ágar MRS (Sigma-Aldrich) e suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubado em condições anaeróbias (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h.

Para a contagem de células viáveis de *S. aureus* utilizou-se ágar Vogel-Johnson (Sigma-Aldrich), suplementado com uma solução de telurito de potássio (1 g/100 mL) (Sigma-Aldrich) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C. Para contagens de células viáveis de *L. monocytogenes*, foram utilizados Ágar Base Seletivo Listeria suplementado com Suplemento Seletivo Listeria (HIMEDIA Laboratories, Índia) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em log de UFC/g.

#### 4.3.2.5 Cálculo da taxa de inibição

Para cada tempo de armazenamento, o grau de inibição foi calculado como:

Taxa de inibição =  $[(N_{\text{control}} - N_{\text{patogen}}) / N_{\text{control}}] * 100$ , onde  $N_{\text{control}}$  foi o log de UFC/g da bactéria patogênica adicionada isoladamente, e  $N_{\text{patogen}}$  foi o log de UFC/g da bactéria patogênica na presença da bactéria ácido láctica (MADUREIRA et al., 2011).

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

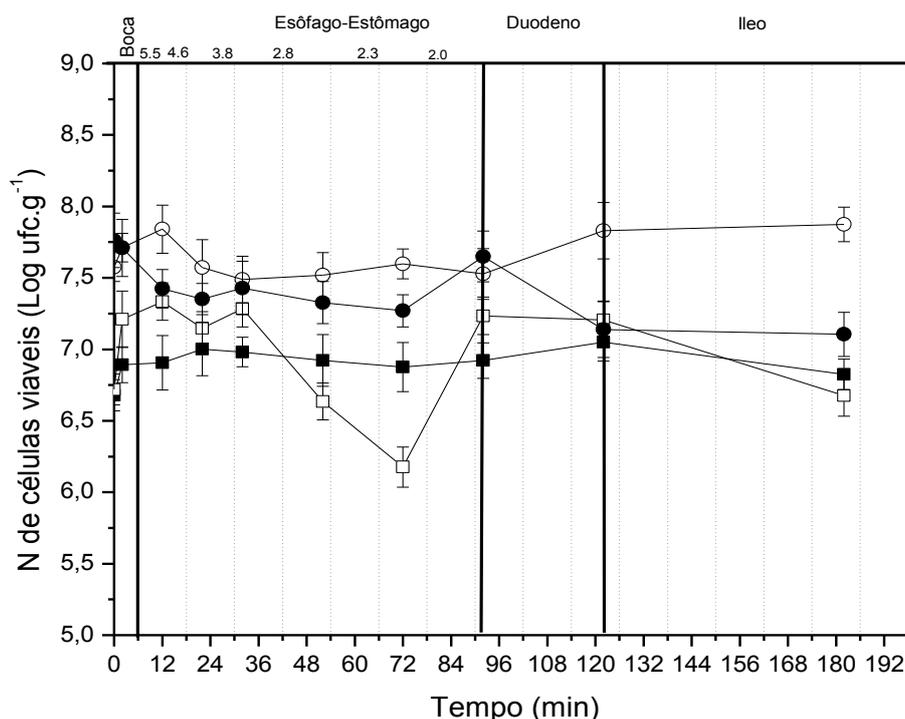
Os resultados dos testes *in vitro* da avaliação do potencial probiótico dos queijos elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Para o cálculo dos dados, utilizou-se o programa - Statistics Analys Systems, versão 8.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC.) (SAS, 1999).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de tolerar estresse digestivo é uma das propriedades importantes para que um probiótico possa ser adicionado em alimentos (ROSS et al., 2005). O experimento realizado neste estudo foi baseado no modelo gastrointestinal utilizado para testar a sobrevivência *in vitro* de bactérias em diferentes condições que imitam a digestão de alimentos semissólidos (MADUREIRA et al., 2011), incluindo a passagem do alimento através de todos os compartimentos do trato gastrointestinal (da boca ao íleo), simulação mecânica (isto é, através de movimentos peristálticos com agitação real) e exposição a um gradiente de pH (como ocorre normalmente durante a digestão), bem como do efeito inibitório destas cepas contra bactérias patogênicas neste tipo de queijo.

As contagens das células viáveis de *L. acidophilus* (LA – 5) no queijo *petit-suisse* caprino e caldo MRS, quando exposto e não exposto ao modelo gastrointestinal simulado são apresentados na Figura 1.

**Figura 1** - Número de células viáveis (média  $\pm$  desvio padrão) de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), quando inoculados em caldo ( $\circ, \bullet$ ) e no queijo ( $\square, \blacksquare$ ), expostos ( $\bullet, \blacksquare$ ) e não exposto ( $\circ, \square$ ) às condições simuladas do tratogastrointestinal em diferentes tempos de incubação.



Nota\*: Os valores de pH que as bactérias foram expostas estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico.

Houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as contagens obtidas para a estirpe de bactéria testada no queijo e no caldo MRS, quando expostos e não expostos (controle) à digestão *in vitro*. As contagens da bactéria probiótica *L. acidophilus* no caldo MRS exposto foram superiores ( $p < 0,05$ ) às contagens nos queijos exposto e não exposto às condições no início e após a digestão. Mesmo assim, tanto no início quanto no final da digestão, a espécie adicionada ao queijo apresentou contagens viáveis, sendo de 6,7 e 6,8 log UFC/g, respectivamente (Figura 1).

Avaliando o comportamento do *L. acidophilus* no caldo MRS, tanto quando foi exposto e não exposto às condições simuladas do TGI, observou-se contagens acima das contagens determinadas no queijo, em que os valores variaram de 7,10 a 7,87 log UFC/g, durante todas as etapas.

Quando adicionadas ao queijo *petit-suisse* e exposto às condições simuladas, o *L. acidophilus* mostrou um aumento no número de células viáveis de aproximadamente 0,21 log ciclos quando expostos às condições bucais. Já durante a exposição às condições de esôfago-estômago simuladas, *L. acidophilus* aumentou seu número de células viáveis dentro de 22 min. de contato com os sucos gástricos (7 log UFC/g), com um pH correspondendo a 4,6 e manteve essa contagem ao final da exposição às condições deste compartimento (6,92 log UFC/g), cujo o pH era em torno de 2. De fato, esse comportamento de resistência às condições ácidas já tinha sido destacado por Hood e Zotolla (1988), que constataram que *L. acidophilus* poderia sobreviver em valores de pH tão baixo quanto 4.0 e que tais valores de pH não afetam a capacidade da bactéria testada em se aderir às células intestinais humanas.

Durante a passagem ao longo do duodeno simulado, o número de células viáveis aumentou ligeiramente, alcançando uma contagem de 7,05 log UFC/g. Após 182 minutos de digestão, no íleo simulado, *L. acidophilus* apresentou o número de células viáveis de 6,83 log UFC/g, apresentando, assim, apenas 0,15 log ciclos inferiores aos encontrados no início da digestão simulada (tempo 0 – 6,68 log UFC/g).

Desta forma, verifica-se que as contagens finais, quando o queijo (exposto e não exposto às condições) alcançou o íleo, estiveram dentro do que a resolução preconiza para esse tipo de produto, variando de 6 a 7 log UFC/g, número mínimo recomendado de bactérias probióticas no alimento no momento do consumo, garantindo um impacto favorável sobre a saúde do consumidor (7-8 log UFC/g) (TALWALKAR et al., 2004). Além disso, deve-se considerar que a contagem total de lactobacilos nestas amostras

antes de serem submetidos ao teste *in vitro* estava de acordo com a legislação brasileira para alimentos funcionais (BRASIL, 2008).

O efeito protetor observado sobre a capacidade de sobrevivência das bactérias probióticas testadas em queijo *petit-suisse* caprino pode estar relacionado com o seu efeito tampão, ao proporcionar um ambiente adequado para a viabilidade destas bactérias (RUASS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002). Em comparação com iogurte e outros leites fermentados, a capacidade tampão superior apresentada pelo queijo se deve ao maior teor de gordura presente na matriz, o que pode melhorar a sobrevivência de bactérias probióticas no estômago e no ambiente intestinal (CRUZ et al., 2009).

As propriedades físico-químicas dos alimentos, como a capacidade tamponante e o pH, influenciam a sobrevivência de estirpes probióticas, durante o trânsito intestinal. Há, também, outros fatores que, possivelmente, poderiam estar envolvidos na sobrevivência do probiótico durante a passagem pelo trato gastrointestinal, como polissacarídeos extracelulares, teor de gordura e a matriz densa de queijos (GARDINER et al., 1999; BOYLSTON et al., 2004).

A capacidade de sobrevivência de bactérias probióticas à ação de sais biliares é um dos critérios utilizados para selecionar potenciais culturas probióticas (MORELLI, 2000). Os sais biliares são importantes na eliminação de bactérias patogênicas presentes no trato gastrointestinal, pois são capazes de solubilizar a membrana plasmática dos agentes patogênicos pela sua ação detergente. Essa ação, porém, não afeta exclusivamente as bactérias patogênicas e os micro-organismos probióticos precisam, portanto, ser tolerantes a esses sais biliares para que possam exercer efeitos benéficos aos seus consumidores (BALLUS et al., 2010), o que foi possível observar neste estudo, em que o *L. acidophilus* não foi afetado pela ação dos sais de bile presentes no duodeno.

As bactérias probióticas podem contribuir para a conservação dos alimentos, devido à sua propriedade antimicrobiana potencial, criada pela ação de diferentes compostos sintetizados por estas bactérias e presentes na matriz de alimentos (DE VUYST et al., 2004). Portanto, essa propriedade de efeitos inibitórios do *L. acidophilus* sobre bactérias patogênicas, a exemplo da *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, no queijo também foi investigada.

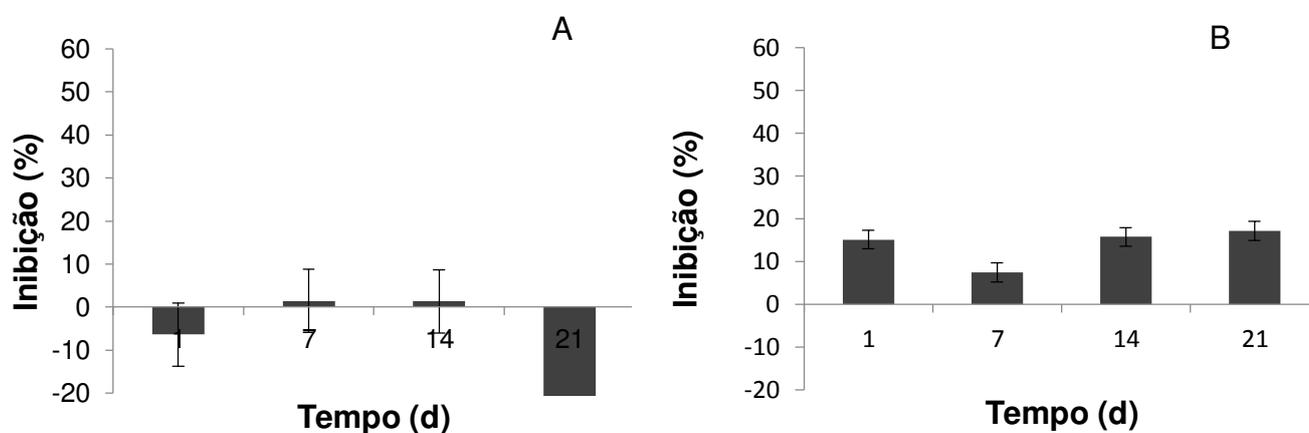
As contagens de células viáveis da bactéria probiótica quando inoculada separadamente no queijo *petit-suisse*, durante 21 dias de armazenamento refrigerado, foi em média de 8-10 log UFC/g, durante todos os tempos armazenamento avaliados; enquanto que as contagens de células viáveis das bactérias patogênicas estavam num

intervalo de 5-8 log UFC/g. Já as quantidades de células viáveis da bactéria probiótica quando inoculada associada com cada bactéria patogênica estavam num intervalo de 5-8 log UFC/g em todos os períodos de armazenamento avaliados.

Observa-se que a contagem de *L. acidophilus* permaneceu alta durante todo o período de armazenagem, seja quando isolado ou quando em competição com os micro-organismos patogênicos. Os resultados para contagem do micro-organismo probiótico sem a presença dos patogênicos assemelham-se aos encontrados por Buriti et al. (2005), que realizaram a contagem de *L. acidophilus* durante a armazenagem por 21 dias no queijo de minas frescal e não observaram diferença significativa na contagem, pois a bactéria manteve-se viável e constante durante a armazenagem.

O curso de tempo de inibição (taxa de inibição) provocada por *L. acidophilus* contra *L. monocytogenes* e é representada na Figura 2.

**Figura 2** – Taxa de inibição de *S. aureus* ATCC 6538 (A) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (B) provocada por *L. acidophilus* (LA-5), em queijo *petit suisse* caprino, durante 21 dias de armazenamento a 7 °C.



Pode-se observar que o *L. acidophilus* mostrou efeito inibitório em todos os dias de armazenagem contra *L. monocytogenes*, reduzindo a taxa de crescimento em torno de 17,15% no 21° dia de armazenagem refrigerado. Já o efeito inibitório contra o *S. aureus* foi inferior, quando comparado a sua ação contra *L. monocytogenes*, inibindo o crescimento desse patógeno em torno de 1,42% aos 7 dias de armazenagem e 1,36% após 14 dias, não sendo efetivo durante todo o armazenagem do queijo.

Fernández et al. (2003) também testaram *in vitro* uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* UO001 de origem humana e obtiveram inibição da multiplicação de *Salmonella*, *Listeria* e *Campylobacter*, sem interferir na microbiota normal do trato gastrintestinal, mas não houve inibição de *S. aureus*.

Segundo um estudo de revisão de Fioramonti et al. (2003), as bactérias lácticas inibem *in vitro* a multiplicação de muitos patógenos entéricos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*. No mesmo sentido, *L. acidophilus* LA1-SCS apresentou atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra vários patógenos, incluindo *S. aureus*, sem interferir na microbiota normal do intestino grosso, como os lactobacilos e bifidobactérias. Os autores atribuíram o efeito a uma substância peptídica, a qual não é bacteriocina, produzida pelo micro-organismo, e não à exclusão competitiva por aderência (BERNET-CAMARD et al., 1997).

A atividade do *Lactobacillus* testado frente às bactérias patogênicas pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, pois esta bactéria é produtora, principalmente dessa substância (COSTA, 2010).

O presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas produtoras. Porém, as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras que teriam se difundido pelo ágar e impedido o crescimento das culturas patogênicas (FUNCK et al., 2011).

Resultados similares do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láctica isoladas de queijos frente a bactérias patogênicas também foram encontrados por outros autores.

Alexandre et al. (2002) demonstraram atividade antagonista de bactérias lácticas contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Em seu estudo Costa (2010) detectou atividade antagonista de *Lactobacillus spp.* contra *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e pouca inibição contra micro-organismos do próprio queijo, *L. rhamonosus* e *L. fermentum*.

Os dados aqui apresentados reforçam a importância de um controle nas boas práticas de fabricação de derivados lácteos, evitando-se uma possível contaminação com níveis altos de patógenos, que podem comprometer a ação protetora dos micro-organismos probióticos presentes na matriz alimentar. Desta forma, os efeitos protetores dos probióticos não devem ser considerados como uma (bio)ferramenta de conservação de alimentos, para uso em matérias-primas com altas contagens de micro-organismos

patogênicos indesejáveis (FERNANDES et al., 2013), com o risco de comprometimento de sua segurança e valor funcional.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, o queijo *petit-suisse* adicionado de cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* revelou características suficientes para caracterizá-lo como potencialmente probiótico.

Os resultados mostraram que cepas de *L. acidophilus* (LA-5), quando adicionado ao queijo *petit-suisse* caprino sobreviveram (contagem maior do que 6 log UFC/g) às condições de digestão gastrointestinal simuladas, o que sugere que essa espécie probiótica é capaz de passar através do trato gastrointestinal, quando adicionada na matriz alimentar, sem sofrer grandes alterações.

Nesse estudo, constatou-se também que a bactéria probiótica estudada mostrou efeito inibitório considerável em todos os dias de armazenamento, demonstrou apenas contra *Listeria monocytogenes*, visto que quando avaliada sua ação contra o *S. aureus*, houve uma pequena inibição apenas no 7º e 14º dia de armazenamento, não sendo efetivo durante todo o armazenamento.

O produto elaborado apresenta potencial probiótico, visto que as bactérias resistiram às condições de digestão simulada, chegando em contagens viáveis no íleo e dentro do que é preconizado pela legislação vigente (acima de 6 log de UFC/g) para que um alimento seja considerado probiótico. Outrossim, ainda apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento, principalmente de *Listeria monocytogenes*.

Reforça-se a importância do desenvolvimento de outros estudos para avaliar a viabilidade das bactérias *in vitro* e, posteriormente, *in vivo* com o objetivo de atestar se o queijo *petit-suisse* adicionado da bactéria probiótica ensaída neste estudo pode ser considerado como um alimento funcional.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTONI, C.; AXELSSON, I.; BRAEGGER, C.; GOULET, O.; KOLETZKO, B.; MICHAELSEN, K. F. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 365-74. 2004.
- AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; HADJI-SFAXI, I.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; MESSAOUDI, S.; KULIYEV, A.; FRANCO, B. D. G. M.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain. **Anaerobe**, v. 20, p. 42-49, 2013.
- ALBUQUERQUE, L. C. Queijos no Brasil. **EPAMIG - ILCT**, Juiz de Fora - MG. (Difusão de Tecnologia do CEPE/ ILCT/ EPAMIG). 1986.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- AMARAL, M. N.; LISERRE, A. M.; MONTEIRO, L. R.; BURITI, F. C. A.; GONÇALVES, L. S.; ZACARCHENCO, P. B.; MORENO, I.; SANTOS, K. M. O. Avaliação da viabilidade de probióticos em queijo de cabra Tipo boursin. **Anais do 3º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2009**, 6 a 7 de agosto de 2009. Campinas/SP. 6 páginas.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v.28, p.348-355, 2013.
- ARAYA, H.; LUTZ, M. R. Alimentos funcionales y saludables. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 30, n. 1, p. 8-14, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). **Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimentos sob inspeção federal**. São Paulo, 2002. [Comunicação].
- AZEVEDO, R. **Leite de cabra**: Município da Paraíba é destaque no Globo Rural, Jun. 2012. Disponível em: < <http://www.portalacteo.com.br/noticias/leite-de-cabra-municipio-da-pb-e-destaque-no-globo-rural-assista-5308/>>. Acesso em: fev. 2014.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos Probióticos: Aplicações como promotores da Saúde humana. **Revista Digital de Nutrição**. v. 3, n. 4, p.396-410, 2009.

BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BECKER, L. V. **Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BELCHIOR, F.; O ingrediente do lácteo saudável. **Leite e Derivados**, v. 13, n. 76, p. 54-64, 2004.

BERNET-CAMARD, M.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L.; HUDAULTS. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance (s) active in vitro and in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2747-2753, 1997.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M. J.; PAGÁN, M. J.; GARCÍA, M. J.; GRAS, M. L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2, p. 273-277, 2003.

BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 372-379, 2002.

BOYLSTON, T. D., VINDEROLA, C. G., GHODDUSI, H. B., REINHEIMER, J. A. Incorporation of *bifidobacteria* into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 mai. 1999. Seção 1, p.11. 1999a.

BRASIL. Secretaria de Agricultura. Portaria nº. 56 de 17 de dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diário Oficial da república Federativa do Brasil**. 1999b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit suisse*. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001a.

Brasil. RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA) Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de saúde, Novos Alimentos/Ingredientes. Substâncias Bioativas e Probióticos. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005.

BRASIL. ANVISA. **VIII - Lista das Alegações Aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em 06 de novembro de 2014.

BUGLIONE, C. C; PEDROTTI, F; VIEIRA, F. N.; SEIFERT, W. Q; MOURINO, J. L; MARTINS, M. L. Avaliação de bacterina e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós larvas de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 45, n. 9, p.40-45, 2008.

BURNS, P.; PATRIGNANI; F.; SERRAZANETTI; D.; VINDEROLA, G. C.; REINHEIMER, J.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 500–512, 2008.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensory properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; RODRIGUES, R.; RUBNIG, H.J. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas/ MG. In: **Anais do 8º Congresso Nacional de Laticínios**, p. 95-97, 1995.

CIENCIA DO LEITE. **Queijo com leite de cabra**. Disponível em <<http://www.cienciadoleite.com.br/queijosdecabra>. > Acesso 25 janeiro 2014.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.

CHOI, S. Y.; CHUNG, M. J.; LEE, S. J.; SHIN, J. H.; SUNG, N. J. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 485–491. 2007.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COSTA, H. H. S. **Potencial probiótico de *Lactobacillus spp.* e *Weisella paramesenteroides* isolados de queijo minas artesanal da Serra da Canastra- MG**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2006. 202 p.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, 344–354, 2009.

DILNAWAZ, P.; SHAKEEL, M.; ZIA UR RAHMAN, A. R. A Review on Probiotics. **International Research Journal Pharmacy**, v. 2, n.3, p. 26- 33, 2011.

DE VUYST, L.; MAKRAS, L.; AVONTS, L.; HOLO, H., YI, Q.; SERVIN, A.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; BERGER, C.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SGOURAS, D.; GONZALES, B. M.; PANAYOTOPOULOU, E.; MENTIS, A.; SMARANDACHE, D. Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria. The first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 16, n. 2-3, p. 125–130, 2004.

DUARTE, D.A.M. **Listeria sp. Em queijo de coalho**. 1999, 71f. Monografia (Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos) - Departamento de Nutrição- Universidade Federal de Pernambuco, Recife: 1999.

EL-ZINEY, M. G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 257-261, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT). **Rebanho caprino mundial**, FAO, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: fev. 2014.

FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacili strains to be used in gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 449-455, 2003.

FERNANDES, M. S.; CRUZ, A. G.; ARROYO, D. M. D.; FARIA, J. A. F.; CRISTIANINI, M.; SANT'ANA, A. S. On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. **Food Control**, v. 34, n. 2, 331–335, 2013.

FIGUEIREDO, E. A. P. Perspectivas da produção de caprinos nas próximas décadas na América Latina. In: CAPRINOCULTURA e Ovinocultura. Piracicaba: FEALQ/ SBZ, 1990. p. 69-83.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

FUNCK, G. D.; HERMANNNS, G.; VICENZI, R. Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite in natura e queijos artesanais frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. In: Encontro de Pós-Graduação da UFPel, 2011, Pelotas. **Anais do XIII Encontro de Pós-Graduação UFPel**. Pelotas: UFPel, 2011.

GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MEDEIROS, A. P. POIATTI, M. L.; RAGAZANI, A. V. F.; HATAYDE, M. C.; CHIODA, T. P.; COAN, R. M.; PIGATTO C. P.; TROVÓ, K. V. P. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, n. 1-2, p. 263-268, 2006.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Development of a probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492. 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews Food Science Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 151-156, 2004.

GUARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999.

HAENLEIN, G. F. W.; CACCESE, R. Goat Milk versus Cow Milk. In: Haenlein FGW and Ace DL. **Extension Goat Handbook**. USA, p. 1-3. 1984.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 1, p. 155-163, 2004.

HELLER, K. J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; deVRESE, M. **Cheese and its potential as a probiotic food**. In: FARNWORTH, E. R., ed. Handbook of fermented functional food. Boca Raton: CRC, 2003. p. 203-225.

HOLD, K. M.; DE BOER, D.; ZUIDEMA, J.; MAES, R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. **International Journal of Drug Testing**, v. 1, n. 1, p. 1-36. 1995.

HOOD, S. K.; ZOTOLLA, E. A. Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, 1514–1516, 1988.

JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 263-267, 2004.

KNIGHTS, M.; GARCIA, G. W. The status and characteristics of the goat (*Capra hircus*) and its potential role as a significant milk producer in the tropics: A review. **Small Ruminant Research**, v. 26, n. 3, p. 203-215, 1997.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3 p. 330-332, 2008.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704–1712. 2007.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P.; NORTJE, G. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. **Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre**. 2002

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Science Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JUNIOR, S. B.; TERRA, N.; FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: Características de qualidade. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n. 3, p. 509-511, 2008.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287–296. 2005.

MARQUES, M. R. H.; MARTINS, R. P.; NETO, A. C. Ocorrência de **Staphylococcus coagulase** positiva em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 21, n° 110, p. 86-94, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDER, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, n. 2-3, p.173-182, 2002.

McLAUHLIN, J. The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. **Food Control**, v.7, n.4/5, p. 235-239. 1996.

MEDEIROS, L. P. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 177 p.

MILES, O.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749. 1938.

MITAL, B. K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hipocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. **Critical Review Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 175-214, 1995.

MOGADO, F. E. F.; BRANDÃO, S. C. C. Ultrafiltração do leite para produção de queijo tipo petit-suisse. **Indústria de Laticínios**, v. 2, n. 1-2, p. 35-34, 1998.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios a Saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORELLI, L. In Vitro Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. **Current Issues Molecular Biology**, v. 1, n. 2, p. 59-67, 2000.

MORETTI, B. R. **Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura láctica em iogurtes**. 2009. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

NERO, L.A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP); 2005.

O'SULLIVAN, M. G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G. C.; COLLINS J.K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends Food Science Technology**, v. 3, p. 309, 1992.

ORDÓÑEZ P. J. A. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2005. 2 v.

OUWEHAND, A. C.; TUOMOLA, E. M.; TOLKKO, S.; SALMINEN, S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 119–126. 2001.

PARK, Y. W.; JUAREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 88-113. 2007.

PEREIRA, R. B. **Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros**. 2007. 27f. Monografia (Especialização em Microbiologia do instituto de Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

QUADROS, D. G. Leite de cabra: produção e qualidade. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 1, Ed. 12, Art. 363, 2008.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G. C. Qualidade nutricional e sensorial do leite caprino e seus derivados. Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte. Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira. **Anais...** João Pessoa, PB. 2003.

RACCACH, M.; McGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 25-32, 1989.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1–7. 2010.

RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 (Supl.), p. 109-115, 2008.

RODRIGUES, A.; QUINTANS, L. J. Produção e beneficiamento do leite de cabra na Paraíba. In: Simpósio Internacional de Caprinos de Corte, 2, Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, 1, João Pessoa/PB, **Anais...** João Pessoa/PB, p. 291-311, 2003.

RODRIGUES, F. T.; VIEIRA, M. D.; SANTOS, J. L. Características microbiológicas do queijo tipo Minas frescal comercializado em Viçosa/MG. In: **Anais do 8º Congresso Nacional de Laticínios**, p. 233-235, 1995.

ROSS, R. P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1410–1417. 2005.

RUASS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, 163–171, 2002.

SAS Institute. **SAS User's Guide: Statistics**; Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC, USA. 1999.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SABIONI, J. C. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *S. aureus*. **Revista Saúde Pública**, v. 22, p. 458-461, 1993.

SANTOS, F. L.; SILVA, M. R.; PITANGUEIRA, B. S.; CONCEIÇÃO, C. F. A. Utilização de probióticos na redução da anemia ferropriva. **Diálogos e Ciência**, v. 7, n. 4, p. 13-18, 2008.

SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011a.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011b.

SOUSA, S.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Isolamento de espécies de *Listeria* em queijo de massa crua tipo coalho comercializada na cidade de João Pessoa – PB. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CBCTA, 2000. p. 4.145.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA, N. M. A.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Campinas**, v. 2, n. 37, p. 127-135, 2003.

TALWALKAR, A.; MILLER, C. W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 605–611, 2004.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

THARMARA, J. N.; SHAH, N. P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, v. 16, n. 1-2, p. 261-76. 2009.

TODOROV, S.; DICKS, L. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2006.

VALERIANO, A. R.; PINTO, J. C.; ÀVILA, C. L. S.; EVANGELISTA, A. R.; TAVARES, V. B.; SCHWAN, R. F. Efeito da adição de *Lactobacillus* sp. na ensilagem de cana – de açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n. 6, p. 1009-1017, 2009.

VARGAS, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 12, p. 1146-1152, 2008.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VEIGA, P. G.; CUNHA, R. L.; VIOTTO, W. H.; PETENATE, A. J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial de queijo *petit-suisse* brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 349-357, 2000.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; Ghiberto, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria a comparative “in vivo” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9, p. 895-904, 2003.

VO, T. S.; KIM, S. K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16-17, 2013.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P. C.; De VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS: Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 305-308, sep. 2000.

ZHAO, R; SUN, J.; TORLEY, P; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1349-1354, 2008.

ZUCCOTI, G. V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of International Medical Research**, v. 36, n.1, p.1-53, 2008.