

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**

**UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE**

**CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO**

**CAROLINY MESQUITA ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE QUEIJO *PETIT-SUISSE* CAPRINO ADICIONADO DE *L. casei* subsp. *paracasei* FRENTE ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL E COMPETIÇÃO COM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

**CUITÉ – PB**

**2015**

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DO QUEIJO  
PETIT-SUISSE CAPRINO ADICIONADO DE BACTÉRIAS *L. casei* subsp. *paracasei*  
FRENTE ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL E  
COMPETIÇÃO COM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

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 Tecnologia dos 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

A663a Araújo, Caroliny Mesquita.

Avaliação in vitro do potencial probiótico de queijo petit-suisse caprino adiconado de *L. casei* subsp. *paracasei* frente às condições simuladas do trato gastrointestinal e competição com bactérias patogênicas. / Caroliny Mesquita Araújo. – Cuité: CES, 2015.

41 fl.

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

Orientadora: Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

1. Bactérias probióticas. 2. Queijo caprino. 3. Patógenos - efeito inibitório. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 579

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DO QUEIJO  
PETIT-SUISSE CAPRINO ADICIONADO DE BACTÉRIAS *L. casei* subsp. *paracasei*  
FRENTE ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL E  
COMPETIÇÃO COM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

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 Tecnologia dos Alimentos.

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

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira  
Universidade Federal de Campina Grande  
Orientador

---

Prof. Msc. Carolina de Miranda Gondim  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador

---

Prof. Msc. Jefferson Carneiro Barros  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador

Cuité – PB

2015

*Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.*

*Aos meus pais e meu irmão, que são essenciais em minha vida.*

*Ao meu namorado, pelo amor e apoio em todos os momentos.*

*E a todos que contribuíram de alguma forma nesta etapa tão importante da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida. Agradeço por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, onde minha fé só aumenta, pelas bênçãos sem fim, pelas alegrias, conquistas e por tudo, sem ti Senhor não sou nada.

Aos meus pais, Everson e Ivaneide, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo apoio e força em todos os momentos alegres e difíceis, e não me deixar desacreditar diante das dificuldades, pelos puxões de orelha nas horas certas, pelas orações, pelos sorrisos e todos os gestos de amor que vocês me transmitem, obrigada por tudo.

Ao meu irmão, Caio, que mesmo longe e com gestos simples sempre dava o seu apoio e atenção.

A minha bisá, Ita, que mesmo sem entender me transmitia seu amor e carinho.

Ao meu namorado, Tony, pelo amor, carinho e compreensão às horas que lhe foram roubadas, pelos momentos de companheirismo, não me deixando desacreditar diante das dificuldades, seu apoio foi e é de fundamental importância na minha vida, você transmite a paz que preciso, o meu muitíssimo obrigado.

A minha professora e tia, Elieidy, pela sua paciência, apoio, amor e carinho em todos os momentos, pela mão amiga, pela sua cumplicidade e por ter acreditado no meu potencial. Tia esse seu sorriso contagia todos, transmitindo sua alegria e felicidade por onde passa, o meu muito obrigado por tudo, minha tia linda.

A minha professora, Carolina Gondim, que abriu as portas do nosso Laboratório para o estudo, por seus preciosos ensinamentos e pelas preciosas considerações para a melhoria do meu trabalho.

Ao professor, Jefferson Barros, que sempre se encontrava a disposição para retirar dúvidas e também pelas suas considerações para a melhoria do meu trabalho.

As minhas amigas, Amanda, Danielle, Laiane, Flaviany, Carol e Morgs, por todo apoio e carinho em todos os momentos. Vou levar vocês para sempre em meu coração, vocês foram essenciais na minha vida, minha família de Cuité. A todas, o meu muitíssimo obrigada.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

*“Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque Eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”*

**Bíblia – Josué 1:9**

## RESUMO

ARAÚJO, C. M. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico do queijo *petit-suisse* caprino adicionado de bactérias *L. casei* subsp. *paracasei* frente às condições simuladas do trato gastrointestinal e competição com bactérias patogênicas. 2015. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

A sociedade atual tem se mostrado bastante interessada na procura de alimentos que trazem benefícios adicionais à saúde, com isso, os prebióticos, probióticos e simbióticos chamam a atenção dos consumidores. Com as diversas pesquisas nessa área, o mercado de laticínios probióticos encontra-se em contínua expansão, sendo desenvolvidos cada vez mais produtos simples e de qualidade. A utilização do leite caprino também vem aumentando, devido as suas qualidades e vantagens, apresentando um alto valor nutritivo e de maior digestibilidade quando comparada ao leite bovino. Logo, neste estudo objetivou-se elaborar e avaliar o potencial probiótico de queijo *petit-suisse* caprino adicionado de *Lactobacillus casei* subsp. *Paracasei*, através da observação da sobrevivência desses últimos às condições simuladas de digestão *in vitro*, assim como identificar seu efeito inibitório contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* nessa matriz alimentar durante 21 dias de armazenamento refrigerado. No final da digestão simulada *in vitro*, a bactéria probiótica testada apresentou uma leve diminuição de suas contagens (6,26 log UFC/g) quando comparada às contagens determinadas antes da exposição às condições da boca (6,31 log UFC/g). Quanto aos efeitos inibitórios desse micro-organismo probiótico contra os patogênicos, verificou-se que esse efeito foi mais pronunciado contra *L. monocytogenes* durante todos os tempos de armazenamento, apresentando após 21 dias uma inibição de aproximadamente 12,18% quando comparado à população inicial desse patógeno. A partir dos resultados obtidos, podemos comprovar que o queijo *petit-suisse* caprino é uma importante matriz alimentar para a proteção da bactéria *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* durante toda a passagem pelo trato gastrointestinal, chegando ao final da digestão em contagens viáveis para promoção de benefícios à saúde do consumidor. Além disso, essa cultura é capaz de inibir e retardar o crescimento de micro-organismos patogênicos, principalmente da *L. monocytogenes* quando presentes nesta matriz alimentar. Desta forma, além deste produto atender às exigências de um alimento que promova saúde e nutrição, fortalece os mecanismos naturais de defesa para o ser humano.

**Palavras chave:** Bactérias probióticas. Sobrevivência. Efeito inibitório contra patógenos.

## ABSTRACT

ARAÚJO, C. M. ***In vitro* evaluation of potential probiotic petit-suisse cheese goat added bacteria *L. casei subsp. paracasei* front of the simulated conditions of the gastrointestinal tract and competition with pathogenic bacteria.** 2015. 41 f. Completion of Course Work (Undergraduate Nutrition) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2015.

Today's society has been very interested in finding foods that bring additional health benefits, thus, prebiotics, probiotics and synbiotics attract the attention of consumers. With the various research in this area, the dairy probiotics market is continuously expanding, being developed increasingly simple and quality products. The use of goat milk has also increased, due to its qualities and advantages, with a high nutritional value and higher digestibility compared to bovine milk. Therefore, this study aimed to develop and evaluate the potential probiotic cheese petit-suisse goats added *Lactobacillus casei subsp. Paracasei* by observaçãoda survival of the latter to the conditions simulated in vitro digestion, and identify its inhibitory effect against *L. monocytogenes* and *S. aureus* that food matrix for 21 days of cold storage. At the end of the simulated digestion in vitro, probiotic bacteria tested showed a slight decrease its count (6.26 log CFU / g) as compared to counts determined before exposure to conditions of the mouth (6.31 cfu / g log). As to the inhibitory effects of the probiotic micro-organism against pathogens, it has been found that this effect was more pronounced against *L. monocytogenes* during the whole storage time, showing an inhibition after 21 days of approximately 12.18% when compared to the initial population this pathogen. From the results, we can confirm that the petit-suisse goat cheese is an important food matrix for the protection of *Lactobacillus casei subsp. paracasei* throughout the passage through the gastrointestinal tract, reaching the final digestion in viable counts to promote benefits to consumer health. Furthermore, this culture is capable of inhibiting and retarding the growth of pathogenic microorganisms, especially when present in *L. monocytogenes* in this food matrix. Thus, addition of this product meet the requirements of a food that promotes health and nutrition, strengthens the natural defense mechanisms in humans.

**Keywords:** Probiotic bacteria. Survival. Inhibitory effect against pathogens.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BHI - Caldo infusão cérebro coração
- °C - Graus centígrados ou celsius (temperatura)
- CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cálcio
- g - Grama
- HCL - Ácido Clorídrico
- Log - Logaritmo
- M - Molar
- mg - Miligrama
- mL - Mililitro
- mM - Milimolar
- Mm - Micrómetro
- MRS - Método Man, Rogosa and Sharpe
- N - Normal
- NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de Sódio
- pH - Potencial hidrogeniônico
- UFC/g - Unidade formadora de colônia por grama

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	22
4.2 COLETA DOS MATERIAIS.....	22
4.3 PROCESSAMENTOS DOS QUEIJOS <i>PETIT-SUISSE</i> CAPRINO COM POTENCIAL PROBIÓTICO.....	23
4.4 TESTES <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS QUEIJOS <i>PETIT-</i> <i>SUISSE</i> CAPRINOS.....	23
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
<b>5 RESULTADOS DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura se mostra como uma atividade pecuária em expansão, em especial nas regiões semiáridas do Nordeste, apresentando uma grande importância socioeconômica, com predominância do sistema extensivo, e entretanto verificam-se baixos índices de produtividade leiteira. Tal fato acontece, principalmente, pela precariedade da tecnologia de processamento dos produtos derivados, aliada a capacitação insuficiente dos produtores e a ausência de padrões de controle higiênico-sanitário, constituindo os principais entraves da agroindústria (GASPAR et al., 2011). A partir dessas dificuldades crescentes, o governo de diferentes instâncias vem planejando e colocando em prática várias estratégias para erguer a economia regional, como a capacitação dos produtores rurais e a geração de novas tecnologias.

A ciência vem colaborando com a tecnologia de alimentos no desenvolvimento de novos produtos, sem o uso de aditivos, conservantes e corantes, sendo o mais natural possível. Associado a isso, pesquisas voltadas para o incentivo da caprinocultura leiteira vêm sendo realizadas e com isso a utilização do leite caprino vem aumentando, tendo em vista os estudos que têm comprovado a qualidade e as vantagens desse tipo de leite, que apresenta um alto valor nutritivo e maior digestibilidade quando comparado com o leite bovino (HAENLEIN, 2004; MCCULLOU, 2004; MONORET-VAUTRIN, 2004). Com isso, vários produtos podem ser obtidos a partir de processos simples e acessíveis aos pequenos produtores, como queijos, iogurtes, bebidas lácteas e outros, sendo uma alternativa para o maior consumo e agregação de valor a estes produtos (SANTOS et al., 2011).

Os consumidores atuais buscam alimentos com composição nutricional balanceada que tragam benefícios adicionais à saúde e, nesse contexto, os alimentos probióticos ganham a atenção destes. O termo probiótico é descrito como culturas de micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício, no entanto, para que tais benefícios sejam alcançados os microorganismos precisam sobreviver ao longo de todo trato gastrointestinal, tolerando os ácidos, a bile, enzimas e em seguida, aderir e colonizar a mucosa intestinal (HUANG; ADAMS, 2004), prevenindo ou inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e a deterioração dos alimentos por bactérias e fungos (AHMADOVA et al., 2013; THARMARAJ; SHAH, 2009). A partir desse potencial, o mercado de laticínios probióticos representa uma forte colocação entre os alimentos funcionais, uma vez que muitas pesquisas

têm sido desenvolvidas, estimulando o crescimento rápido e a contínua expansão dessa categoria de alimento (STANTON et al., 2001).

Nesse contexto destaca-se o queijo *petit-suisse* probiótico, que é obtido a partir da coagulação do leite com o coalho e adicionado de bactérias probióticas, que podem trazer benefícios a saúde, promovendo uma melhoria na microflora intestinal natural (ANNUNZIATA; VECC, 2013). Destaca-se que até o presente momento que, são escassos os estudos direcionados ao papel protetor do queijo *petit-suisse* na sobrevivência de bactérias probióticas em condições semelhantes ao trato gastrointestinal de humanos, como também o efeito inibitório destas bactérias contra patógenos neste tipo de queijo, o que justifica a realização deste estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar e avaliar o potencial probiótico do queijo *petit-suisse* caprino adicionado de bactérias *L. casei* subsp. *paracasei*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O estudo desses alimentos conhecidos como funcionais vem se tornando bastante intenso nos últimos anos, a busca de efeitos benéficos para o organismo e de seus componentes responsáveis por esse efeito aumentou significativamente. O termo funcional assumiu o compromisso de proporcionar algum benefício fisiológico adicional, além de garantirem efeitos nutricionais adequados.

Alimento funcional é um termo utilizado para alimentos que propiciam algum benefício à saúde das pessoas, seja em uma ou mais funções do organismo. Além de ser utilizado como fonte de substrato e de energia para a formação das células dos tecidos, possui também substâncias que vão atuar ativando e aperfeiçoando os processos metabólicos, promovendo uma melhor condição de saúde, melhorando a efetividade do sistema imune e o bem-estar dos consumidores, evitando assim o aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas, reduzindo o risco de doenças que prejudicam a longevidade. Dessa forma, os alimentos funcionais apresentam condições que proporcionam diversos benefícios à saúde, através de mecanismos não convencionais da nutrição, salientando que esse efeito não está relacionado à cura de doenças e sim a melhoria da saúde (SANDERS, 1998).

O principal objetivo dos alimentos funcionais é de melhorar, manter e reforçar a saúde das pessoas pela via da alimentação. A procura por esses alimentos aumentou bastante, isso pelo fato que a população está mais preocupada com prevenção do que com a cura de doenças, estando assim ciente sobre a relação entre a alimentação e a saúde. Hoje em dia eles fazem parte da nossa vida, estando assim como prioridade no âmbito das pesquisas, de onde tem se esclarecido suas propriedades e seus benefícios à saúde. O setor lácteo se encontra à frente nas empresas e a criação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria tem como foco a promoção de saúde, estimulados pela crescente demanda da adoção das pessoas a uma alimentação adequada por alimentos saudáveis, como os probióticos (SAARELA et al., 2000).

A denominação legal de alimento funcional foi estipulada em 1991, de acordo com o sistema “Alimento Destinado ao Uso Específico da Saúde” – Food For Specific Health Use (FOSHU) da legislação de alimentos Japonesa (ROBERFROID, 2000; STANTON et al.,

2005). No Brasil, a legislação é recente, trata-se da resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVS/MS), número 18 de 30/04/1999 que dá as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas na rotulagem de alimentos, sendo discutidos três tipos de alegações sobre o conteúdo, a função metabólica e de saúde. A alegação de propriedades funcionais ou de saúde é permitida em caráter opcional, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente produzir efeitos metabólicos, fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica. A portaria ANVS/MS número 19 de 30/04/1999 regulamenta os procedimentos para o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem. Não são aprovadas as alegações para ingredientes ou componentes dos alimentos, e sim para o produto final que tenha esses ingredientes ou componentes. A comprovação da eficácia da alegação deve ser realizada caso a caso, considerando a formulação e as características do alimento, portanto o uso das alegações em qualquer alimento só será permitido após a aprovação da ANVISA (BRASIL, 1995).

Os probióticos, simbióticos e prebióticos são nutrientes que possuem propriedades funcionais, que tem efeitos benéficos ao organismo, contribuindo para a melhoria da flora intestinal do cólon, que é um importante fator no equilíbrio e na manutenção da saúde (COLLINS; GIBSON, 1999).

### 3.2 PROBIÓTICOS

Em 1989, o termo probiótico foi considerado como um suplemento de micro-organismos vivos que afetam de forma benéfica o equilíbrio da microbiota intestinal. E só em 2002, esse conceito foi reafirmado em uma reunião de especialistas promovida pela Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

A primeira geração de componentes de alimentos funcionais com atividade benéfica à saúde foi o cálcio e as vitaminas. Com o passar dos anos, esse conceito se voltou para os aditivos alimentares, que exerciam efeitos sobre a microbiota intestinal do organismo, atualmente os prebióticos e os probióticos são aditivos que compõem esses alimentos funcionais (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Os probióticos são representados como culturas de uma única espécie ou de diversas espécies de micro-organismos, que quando são utilizadas pelo homem vão trazer benefícios à saúde. Muitas pesquisas são desenvolvidas para incorporar esses organismos (probióticos) em vários produtos, por representarem alimentos funcionais (STANTON et al., 2001).

O micro-organismo probiótico deve sobreviver às condições adversas do estômago para colonizar o intestino, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

As principais características dos probióticos são sua capacidade para resistir ao suco gástrico ácido, sais biliares e às enzimas digestivas no estômago, adesão à mucosa intestinal, convívio com a microbiota intestinal endógena e produção de substâncias que vão inibir o crescimento de bactérias indesejáveis, como exemplo as patogênicas. Estas características são específicas de cada cepa e quando aplicados em alimentos os probióticos devem ser estáveis. É de fundamental importância a sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de  $10^6$  UFC/ ml ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN; LUTZ, 1998).

Em condições normais, nosso intestino possui inúmeras espécies de bactérias, essa composição o torna capaz de responder a diversas variações anatômicas e físico-químicas, quando em equilíbrio ele impede que micro-organismos patogênicos presentes exerçam seus efeitos patogênicos, mas quando este se encontra em desequilíbrio o resultado esperado é a proliferação de patógenos, gerando posteriormente uma infecção bacteriana (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Alguns benefícios gerados pelos micro-organismos probióticos merecem destaque, sendo estes: o controle das infecções intestinais; estímulo da motilidade intestinal; alívio da constipação intestinal; melhor absorção de alguns nutrientes; diminuição dos níveis de colesterol; o efeito anticarcinogênico; estímulo do sistema imunológico, pelo estímulo da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos no intestino; melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar; exclusão competitiva e produção de compostos antimicrobianos (LEE *et al.*, 1999; GOMES, MALCATA, 1999; SREEKUMAR, HOSONO, 2000; NAIDU, CLEMENS, 2000).

Segundo Goldin (1998), em 1995 o termo probiótico foi introduzido pela médica Lilly e Stillwell para descrever micro-organismos que desempenham funções benéficas sendo definidos como micro-organismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas vão agir no trato gastrointestinal do organismo, a qual confere um efeito favorável à saúde do hospedeiro, melhorando o balanço microbiano intestinal e para que esse processo aconteça

dois pontos precisam ser bem enfatizados, os micro-organismos precisam estar vivos e em quantidade adequada.

A definição de probióticos é discutida por autores pelas suas amplas vantagens, pois não restringe os efeitos somente à microbiota intestinal, mas também às comunidades microbianas de outras partes do corpo, sendo constituídos de uma ou mais espécies. Segundo Naidu e Clemens (2000), o espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

A alegação de produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do micro-organismo presente, também devendo ser declarado que o consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos saudáveis. No Brasil, a legislação estabelece uma quantidade mínima viável de cultura probiótica deve ser de  $10^8$  e  $10^9$  UFC que equivale a uma porção diária de 100 g de um produto contendo  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g, tendo ainda, no rótulo do produto a população probiótica que foi utilizada (ANVISA, 2008).

O emprego de bactérias probióticas no desenvolvimento de tecnologias é um campo que requer mais estudos, a fim de estabelecer definitivamente o mecanismo de ação dessas culturas e os veículos para que essas culturas atinjam concentrações efetivas e de maneira a exercer o seu efeito, a nível intestinal. Na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios o uso das culturas probióticas deve ser utilizado com base na seleção de cepas probióticas para uso humano e as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. As culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas apresentam uma boa multiplicação no leite, gerando propriedades sensoriais adequadas, devendo ser estáveis e viáveis no armazenamento. Em geral, pode se dizer que o processamento de alimentos contendo bactérias probióticas vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, sendo suas características de viabilidade e funcionais mantidas, principalmente em leites fermentados e queijos (OLIVEIRA et al., 2002).

Após alguns testes, verificou-se que a sobrevivência das bactérias probióticas em queijos frescos é maior que em queijos maturados. Essa sobrevivência maior está relacionada ao menor tempo de armazenamento dos queijos frescos, ao menor teor de sal e ao maior teor de umidade e atividade de água, que não limitariam a multiplicação do probiótico (BURITI, 2005).

### 3.3 LEITE CAPRINO

O leite de cabra é definido pela legislação brasileira como “produto normal, fresco e integral, obtido da ordenha completa e ininterrupta de animais sadios, bem alimentados e em repouso” (BRASIL, 1999a).

O leite caprino destaca-se dentre os outros tipos de leite por apresentar componentes importantes para a nutrição humana, como caseína, albumina, matérias orgânicas e nitrogenadas, que são de fundamental importância para a constituição dos tecidos e sangue; gordura insaturada, que contribui para circulação sanguínea; sais minerais, necessários para a formação do esqueleto; e também, vitaminas e fermentos lácticos, sendo estes favoráveis à digestão e capazes de exercer ação de defesa frente às bactérias patogênicas a nível intestinal (HAENLEIN, 2004).

A composição química do leite caprino está diretamente envolvida com a sua qualidade nutricional, sendo este constituído de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais. O destaque dos ácidos graxos é o ácido linoléico conjugado (CLA), que é considerado um componente nutracêutico da gordura do leite, pelo fato de apresentar atividades anticarcinogênica e antiteratogênica; habilidade para diminuição dos efeitos catabólicos da estimulação imune; redução de reservas corporais de gordura, e a promoção de crescimento. Atua também sobre os efeitos secundários da diabetes e da obesidade (OSMARI et al., 2011). Sendo assim, a sua importância na alimentação se deve ao seu alto valor nutritivo, elevada digestibilidade quando comparado ao leite bovino e as características terapêuticas e dietéticas (HAENLEIN, 2004).

Em comparação com o leite bovino, o leite de cabra apresenta teores aproximados de vitaminas, exceto as vitaminas B6, B12 e ácido fólico que são reduzidos. As cabras possuem uma característica fisiológica, que é a conversão de todo o caroteno em vitamina A, apresentando assim um maior teor dessa vitamina. O leite de cabra também apresenta maior teor de cálcio, potássio, magnésio, fósforo, cloro e manganês e menor teor de sódio, ferro, zinco, enxofre, molibdênio e cobalto, estando esse último relacionado com a taxa reduzida de vitamina B12 (FISBERG, 1999).

A importância do leite de cabra na alimentação infantil está tanto no valor biológico de seus nutrientes como em suas características de hipoalergenicidade. De acordo com Jardim (1984) e Medeiros et al. (1994), o leite de cabra é o alimento ideal para crianças, pessoas idosas, doentes e convalescentes, pois além de ter boa composição nutricional, não provoca o aparecimento de cólicas estomacais, podendo mesmo, em alguns casos, eliminá-las. Também

é recomendado para crianças alérgicas ao leite de vaca, em pessoas que fazem tratamento quimioterápico, porque pode diminuir a queda de cabelos, que ocorre com este tipo de tratamento, em crianças com problemas de desenvolvimento físico, pois a concentração de cálcio e sua absorção são maiores, para pessoas com problemas digestivos, úlcera, gastrite, pois devido a sua composição, diminui a acidez e contribui para a cicatrização das paredes do estômago. Nos casos de problemas respiratórios, gripes, bronquite, o leite de cabra sempre foi indicado. A cabra é o único animal que continua produzindo anticorpos no leite durante toda a lactação, diferentes dos humanos que produzem apenas até o sexto mês.

Segundo Fisberg (1999), o leite de cabra tem características únicas, como: alta digestibilidade, alcalinidade distinta e maior capacidade tamponante. A partir do leite caprino podem ser obtidos produtos como queijos, iogurtes e bebidas lácteas, agregando valor a estes produtos (SANTOS et al., 2011).

### 3.4 QUEIJO *PETIT-SUISSE*

O queijo é o produto fresco ou maturado resultante da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho (BRASIL, 1996).

A produção de queijos no Brasil dobrou em 10 anos, de cerca de 195 mil toneladas em 1991 para cerca de 394 mil toneladas em 2001 e projetava-se um volume de 414 mil toneladas para o ano de 2002 (ABIQ, 2002). A produção mundial desses produtos alimentícios é de cerca de 35% da produção total de leite.

Segundo Johson e Law (1999), as perspectivas de um incremento ainda maior nas vendas de queijo mundialmente, no que diz respeito a valor agregado, pode ser conseguida por meio da fortificação com cálcio e vitaminas, bem como pela adição de novas culturas lácticas, a exemplo das probióticas. Dentro deste contexto, destaca-se como produto que pode ser incrementado o queijo *petit-suisse*, por ser um produto consumido como sobremesa, principalmente, por crianças.

Além de boa viabilidade no intestino, as propriedades tecnológicas são pré-requisitos para utilização potencial de culturas probióticas em queijos (KASK et al., 2003). Diversos tipos de queijos foram testados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, revelando-se apropriados. Dentre os queijos testados para esse fim, destacam-se os queijos Cheddar (GARDINER et al., 1998), Gouda (GOMES; VIEIRA;

MALCATA, 1998), Cottage (BLANCHETTE et al., 1996), Crescenza (GOBBETTI et al., 1997) e queijo fresco (BURITI et al., 2005), havendo poucos relatos para o queijo *petit-suisse*.

Desenvolvido por Charles Chervais em 1850, o queijo *petit-suisse* 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). Possui consistência cremosa e pode ser adicionado de ingredientes doces ou salgados. Este produto 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).

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 (ABIQ, 2002). O incremento desta variedade de queijo com culturas probióticas, assim como a utilização de leite de cabra em sua elaboração, constitui-se como alternativa para o aumento em sua produção, visto a oferta de um alimento funcional e nutritivo.

O queijo elaborado a partir do leite de cabra adicionado de culturas probióticas, se constitui como alternativa para o aumento da sua produção e uma opção para consumo por grupos específicos (alérgicos ao leite e derivados bovinos, bem como pessoas com intolerância à lactose), visto que é um alimento funcional e nutritivo interessante, atendendo, assim, aos anseios da população por alimentos que promovam saúde, além da nutrição.

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES ENCONTRADOS EM QUEIJOS

O queijo é um tipo de produto fabricado de forma artesanal, onde pode ocorrer à contaminação por vários micro-organismos, comprometendo a sua qualidade e a segurança da saúde do consumidor. Desta forma, se faz necessário o uso de práticas adequadas de higiene, prevenindo uma possível contaminação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nos últimos anos, houve crescente interesse em identificar as causas de doenças gastrintestinais humanas, as enterotoxinas e os fatores de virulência causadores de doença. As bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia* spp. e *Shigella* spp. são as principais responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação e infecção alimentar no homem. Essas bactérias podem causar doenças pela sua capacidade de multiplicação como também pela produção de toxinas (VIEIRA et al., 2008).

Dentre os micro-organismos patogênicos, o *S. aureus* causa intoxicação provocada pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, produzidas durante a sua proliferação no alimento. Essas enterotoxinas são proteínas termorresistentes, posto que embora com a pasteurização do leite o *S. aureus* seja destruído, não há inativação das enterotoxinas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Outro micro-organismo que merece destaque entre os principais contaminantes de alimentos é a *Listeria monocytogenes*, que é amplamente disseminada na natureza, tanto em homens como nos animais e ambiente. Devido a sua patogenicidade, causando a listeriose, variadas manifestações clínicas podem se apresentar: septicemia que pode resultar em aborto, endocardite, conjuntivite, meningite e outros. Esse patógeno apresenta crescimento na faixa de 2,5 a 44 °C, se multiplicando em temperatura de refrigeração, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Para um melhor controle sanitário na área de alimentos, 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, como é o caso do queijo *petit-suisse*, que visa à qualidade microbiológica dos produtos alimentícios e a proteção da saúde do consumidor (BRASIL, 2001).

Para a redução dos riscos de contaminação produzindo alimentos mais seguros é necessário que o leite passe por um processo de pasteurização, que passe por um programa de segurança alimentar do tipo Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), pois esse monitoramento garante a segurança do produto final. Faz-se necessário também uma maior atenção das autoridades sanitárias em relação à autorização de funcionamento de produção e comercialização desse produto, uma vez que a ingestão de qualquer tipo de queijo contaminado por bactérias patogênicas e toxinas podem acarretar sérios riscos à saúde humana (VIEIRA et al., 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Tecnologia dos Alimentos (LTA) e Microbiologia de Alimentos (LABMA), do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* de Cuité/PB.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Tratou-se de uma pesquisa de laboratório, com o propósito de avaliar o queijo *petit-suisse* caprino adicionado de *L. casei* subsp. *paracasei*.

A pesquisa em laboratório é uma técnica de investigação mais complexa, entretanto mais exata, descrevendo e analisando o que ocorrerá em determinadas condições controladas, exigindo instrumentos específicos e precisos, sendo estes, realizados em ambientes adequados (MARCONE; LAKATOS, 2002).

### 4.2 COLETA DOS MATERIAIS

O leite de cabra da raça *Toggenburg* foi coletado de um criador de cabras da cidade de Nova Floresta/PB, sendo levado em recipiente isotérmico até o Laboratório de Tecnologia dos Alimentos, onde foi pasteurizado (65 °C/30 min.) e depois armazenado sob refrigeração até o momento do processamento do queijo.

A cultura lática probiótica, o ácido láctico e o coalho que foram utilizados na produção do queijo *petit-suisse* foram disponibilizados pela Christian Hansen® (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 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.

### 4.3 PROCESSAMENTOS DOS QUEIJOS *PETIT-SUISSE* CAPRINO COM POTENCIAL PROBIÓTICO

O queijo *petit-suisse* caprino foi processado em triplicata. Para tanto, primeiramente elaborou-se a massa-base para produção do queijo Quark, a partir do qual se elaborou o queijo *petit-suisse*. Para este processamento, após aquecimento do leite a 37 °C, o ácido láctico foi adicionado, havendo uma rápida homogeneização, e a cultura probiótica foi adicionada numa proporção de 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 (Nordeste Fruit, Brasil), açúcar refinado União (Coopersucar-União, Limeira, Brasil) e corante natural (Emultina Selecta®). 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.

### 4.4 TESTES *IN VITRO* DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS QUEIJOS *PETIT-SUISSE* CAPRINOS

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 na avaliação do efeito inibitório dessa cultura probiótica adicionada ao queijo contra bactérias patogênicas contaminantes, *Staphylococcus aureus* e a *Listeria monocytogenes*.

#### **4.4.1 Avaliação da sobrevivência das bactérias em condições gastrointestinais simuladas**

Após processamento dos queijos conforme a metodologia descrita em 4.3, e armazenamento por sete (7) dias, sob temperatura de refrigeração (7 °C), procederam-se as análises da seguinte forma:

#### 4.4.1.1 Inoculação das matrizes de queijos

Um conjunto de três amostras rotuladas como C1, C2 e S1 foi produzido. 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 na 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., o qual os queijos 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.

#### 4.4.1.2 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal que foi utilizada está descrita no Quadro 1, incluindo compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas, simulando os movimentos peristálticos.

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 em 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 de maneira 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 esterilizados por filtração, usando membrana filtrante de 0,22  $\mu$ m (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. O Banho Maria digital tipo Dubnoff (com temperatura ajustada para 37 °C e agitação mecânica) foi usado para simular a temperatura do corpo humano com movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo.

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

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-estômago	Pepsina		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. (2011a).

#### 4.4.1.3 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis de bactérias lácticas adicionadas aos queijos 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. casei* subsp. *paracasei* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) e incubado a 37 °C/48 h. O resultado foi expresso em log das unidades formadoras de colônias por cada grama de queijo (log de UFC/g). O pH de cada amostra foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrointestinais com um medidor de pH (modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90 mL/100 mL).

#### **4.4.2 Avaliação do efeito inibitório das bactérias ácido láticas no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes***

##### *4.3.2.2 Preparação dos inóculos*

Para preparar os inóculos que foram adicionados ao queijo, o *L. casei* subsp. *paracasei* 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). As cepas de *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 verificação dos 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, estas diluições foram subsequentemente plaqueadas, 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.

##### *4.4.2.3 Processamento dos queijos tipo coalho caprinos*

Seguiu-se a metodologia mencionada em 4.3, com exceção da adição da cultura ácido láctica probiótica.

##### *4.4.2.4 Adição dos inóculos de bactéria ácido láctica e patogênicas nos queijos*

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. As amostras de queijos experimental consistiram nos queijos adicionados 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.

#### 4.4.2.5 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 determinação do *L. casei* subsp. *paracasei*, sendo plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) 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.

#### 4.4.2.6 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 testada (MADUREIRA et al., 2011b).

#### 4.5 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

### 5.1 SOBREVIVÊNCIA DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

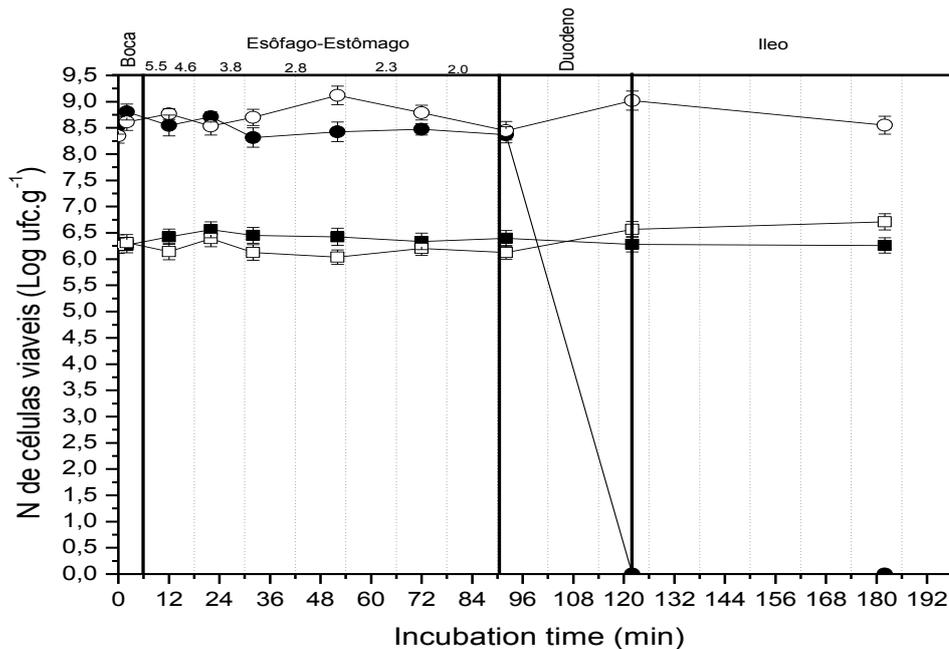
O trato gastrointestinal do homem é composto por uma mistura dinâmica e complexa, com mais de 1000 espécies de micróbios diversificados que habitam o intestino humano (MACKIE, 2002). A colonização bacteriana do trato intestinal é afetada por diversos fatores, como a digestão de nutrientes, a maturação das células epiteliais, parâmetros fisiológicos e outros, se tornando complicada sua análise. Ao longo dos anos, constatando essa dificuldade e as questões éticas envolvidas na experimentação direta das condições do TGI, foi projetado e desenvolvido simuladores do trânsito intestinal, os chamados testes *in vitro*, que simulam todas as etapas da digestão, incluindo suas especificidades mecânicas e microbianas, prevendo o processo antes de testá-los *in vivo* (MADUREIRA et al., 2007).

A viabilidade das bactérias probióticas no TGI depende da origem, gênero, espécie da bactéria e características físico-químicas do alimento a qual a bactéria está inserida. Pesquisas sobre a resistência de algumas estirpes probióticas no TGI foram desenvolvidas, e constataram que sua principal característica é a capacidade de tolerar tensões digestivas, sendo conhecidos como agentes profiláticos, que atuam na manutenção da homeostase intestinal e na prevenção de doenças (CANNY, MCCORMICK, 2008).

No presente estudo foi realizado o teste *in vitro* da digestão de um alimento semissólido, avaliando a sobrevivência da bactéria láctica nos diversos compartimentos do trato gastrointestinal (da boca ao íleo), a partir da simulação mecânica (movimentos peristálticos), exposição ao gradiente de pH, sucos gástricos, bile e outros que imitam a digestão normal de alimentos (MADUREIRA et al., 2011a).

As contagens de células viáveis de *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01), no queijo *petit-suisse* quando exposto ao modelo gastrointestinal simulada são apresentados na Fig. 1.

**Figura 1** - Os números de células viáveis (média  $\pm$  desvio padrão) de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (*L. casei*-01) 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. Os valores de pH que as bactérias foram expostas estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico.



Houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem obtida para a bactéria testada no queijo e no caldo MRS, quando expostos e não expostos (controle) à digestão *in vitro*. De modo que, no início da digestão simulada, a estirpe bacteriana testada manteve a viabilidade mais elevada de células no caldo MRS (exposto e não expostos), com valores entre 8-9 log UFC/g, do que nos queijos (exposto e não exposto), com valores de 6-7 log UFC/g. Ainda observou-se, que não houve grandes variações nas contagens desta bactéria ( $p > 0,05$ ), quando adicionada ao queijo, durante a travessia dos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal, estando assim, dentro dos níveis de 6-7 log UFC/g, número mínimo de bactérias recomendado para garantir um impacto favorável sobre a saúde do consumidor (TALWALKAR et al., 2004).

Todavia, após 122 min. de exposição às condições gastrointestinais simuladas a cepa adicionada ao caldo morreu. Diferentemente, no caldo MRS não exposto, as contagens permaneceram entre 8-9 log UFC/g até o final da digestão. Já a bactéria probiótica ensaiada no queijo no início da digestão, antes do queijo ser exposto às condições simuladas da boca (tempo 0), apresentou contagens viáveis de 6,31 log UFC/g, e ao final da digestão

experimental essa contagem caiu para 6,26 log UFC/g, o que correspondeu a uma redução de apenas 0,79% dessa contagem inicial.

A bile é uma solução aquosa, constituída essencialmente por ácidos biliares, colesterol, fosfolipídios e biliverdina. Os ácidos biliares são sintetizados pelo fígado a partir do colesterol, e é excretada da vesícula biliar para o duodeno após a ingestão de alimentos (HOFMANN; RODA, 1984). As características antimicrobianas da bile de dissolver membranas bacterianas surgem a partir das suas propriedades de detergente natural, que tem como função facilitar a digestão de componentes hidrofóbicos da dieta, sua natureza torna um forte inibidor das bactérias, restringindo a sobrevivência de bactérias no trato gastrointestinal (MADUREIRA et al., 2011a). Possivelmente, devido à exposição maior aos ácidos biliares, o *L. casei* subsp. *paracasei* quando presentes no caldo não conseguiram se recuperar tão facilmente, ao contrário de quando esse micro-organismo estava dentro matriz alimentar.

Sendo assim, verificou-se que o caldo MRS contendo *L. casei* subsp. *paracasei* não exerceu efeito protetor sobre a sobrevivência dessa cepa quando exposta às condições de digestão simuladas. Em contrapartida, a sobrevivência da bactéria probiótica ensaiada foi garantida pela proteção exercida pela matriz alimentar utilizada como transportadora desta cepa até que a mesma atingisse o trato intestinal. Destaca-se que a possibilidade do alcance desse micro-organismo em contagens viáveis pode proporcionar a mediação dos seus efeitos benéficos e terapêuticos para o consumidor (OUWEHAND et al., 2001).

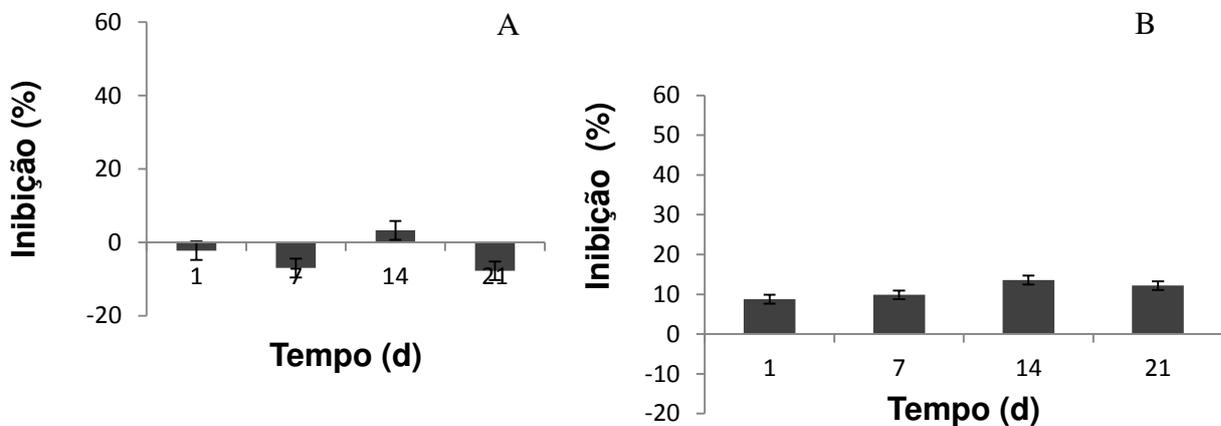
O efeito protetor observado sobre a capacidade de sobrevivência das bactérias probióticas testadas em queijo *petit-suisse* caprino pode estar relacionado com o seu efeito tampão, ao proporcionar um ambiente adequado para a viabilidade destas bactérias (RUASS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002). Quando comparado com iogurtes e outros leites fermentados, o queijo *petit-suisse* apresentada uma capacidade tampão superior, isso ocorre devido ao maior teor de gordura presente na matriz, o que pode melhorar a sobrevivência de bactérias probióticas no estômago e no ambiente intestinal, gordura esta derivada do leite de cabra e do creme de leite que foi incorporado ao queijo durante o processamento (CRUZ et al., 2009).

Reforça-se que ao final da digestão, a bactéria probiótica testada no queijo alcançou o intestino em quantidades aceitáveis (6,26 log UFC/g) para aderir à parede intestinal, colonizar o intestino com eficácia e desta forma exercer suas atividades biológicas.

## 5.2 EFEITOS INIBITÓRIOS DE *L. casei* subsp. *paracasei* SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM QUEIJO

As taxas de inibição de *S. aureus* e *L. monocytogenes* provocadas por *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01,) no queijo *petit-suisse* são apresentados na Figura 2.

**Figura 2** – Taxa de inibição de *S. aureus* ATCC 6538 (A) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (B) provocada pela *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01), em queijo *petit suisse* caprino, durante 21 dias de armazenamento a 7 °C.



Pode-se observar que o *L. casei* subsp. *paracasei* mostrou efeito inibitório em todos os dias de armazenamento contra *L. monocytogenes*, reduzindo a taxa de crescimento em torno de 8,76%, 9,86%, 13,59% e de 12,18% nos 1º, 7º, 14º e 21º dias de armazenamento, respectivamente. 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 3,28% apenas aos 14 dias de armazenamento, não sendo, portanto, efetivo durante todo o armazenamento do queijo.

As bactérias lácticas possuem diversas características que as tornam adequadas para a terapêutica probiótica, que são mecanismos como a exclusão competitiva, produção de compostos antimicrobianos, modulação da resposta imune, mudanças na atividade metabólica bacteriana intestinal, inibição da translocação bacteriana, entre outros, criando um ambiente desfavorável para o crescimento de bactérias contaminantes e patogênicas (MADUREIRA et al., 2007). Desta forma, a incorporação destas bactérias em produtos alimentares, com objetivo de aumentar sua vida de prateleira é de fundamental importância e interesse comercial (SOOMRO et al., 2002).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos revelaram que o queijo *petit-suisse* em questão apresentou melhor efeito protetor para a bactéria probiótica, quando comparado ao caldo, em que *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01) sobreviveu às condições de digestão gastrointestinal simuladas, o que sugere que espécies probióticas são capazes de passar através do trato gastrointestinal, quando adicionadas na matriz alimentar, sem sofrer tantas alterações. Por sua vez, essas contagens estiveram dentro dos níveis de 6-7 log UFC/g, número mínimo de bactérias recomendado para garantir um impacto favorável sobre a saúde do consumidor.

Neste estudo constatou-se também que a bactéria probiótica estudada não mostrou efeito inibitório contra a *S. aureus*, havendo efeito direto apenas contra *Listeria monocytogenes*, que foi inibida em todos os dias de armazenamento.

Desta forma, o queijo *petit-suisse* caprino além de atender às exigências de um alimento que promove saúde e nutrição, por sua característica funcional, pode fortalecer os mecanismos naturais de defesa para o ser humano, potencializando sua comercialização como alimento com características funcionais.

Ademais, reforça-se a importância do desenvolvimento de outros estudos para avaliar a viabilidade do *L. casei* subsp. *paracasei* *in vitro* e, posteriormente, *in vivo* com o objetivo de atestar se o queijo *petit-suisse* adicionado desta bactéria probiótica pode ser considerado como um alimento funcional.

## REFERÊNCIAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; HADJI-SFAXI, I.; CHOISET, 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, n. 42-29, p. 1-8, 2013.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 1, p. 348-355, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br / Alimentos / comissoes /> tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/Alimentos/comissoes/)>. Acesso em 18 jan, 2014 .

ARVANITOYANNIS, I. S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 5, p. 385-404, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). **Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimentos sob inspeção federal**. São Paulo, 2002.

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

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**. 1999a.

BRASIL. 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. 1999b.

BRUNO, F. A.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, pp. 2740-2744, 2002.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technology**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005.

BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. 86 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

CANNY, G. O., MCCORMICK, B. A., Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within?. **Infection Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3360-3373, 2008.

CASTRO, W. F.; CRUZ, A. G.; BISINOTTO, M. S.; GUERREIRO, L. M. R.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; CUNHA, R. L.; DELIZAT, R. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 16-25, 2013.

COLLINS, M; GIBSON, G. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1052-1057, 1999.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J.; CARVALHO, R. T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

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.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2014. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FISBERG, M.; NOGUEIRA, M.; FERREIRA, A. M. A.; FISBERG, R. M. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Revista de Pediatria Moderna**, v. 35, n. 7, p.526-537, 1999.

FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 182 p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GAMBELLI, L.; MANZI, P.; PANFILI, V.; PIZZOFERRATO, L. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. **Food Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 353-358, 1999.

GASPAR, P.; ESCRIBANO, A. J.; MESÍAS, F. J.; ESCRIBANO, M.; PULIDO, A. F. Goat systems of Villuercas-Ibores area in SW Spain: Problems and perspectives of traditional farming systems. **Small Ruminant Resear**, v. 97, n. 1-3, p. 1-11, 2011.

GONCALVES, H. C.; SILVA, M. A.; WECHSLER, F. S. and RAMOS, A. A. Fatores genéticos e de meio na produção de leite de caprinos leiteiros. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 719-729. 2001.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4777-4786. 2011.

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

HOFMANN, A. F.; RODA, R. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. **Journal of Lipid Research**, v. 25, n. 13, p. 1477-1489, 1984.

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, pp. 1514-1516, 1988.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253-260, 2004.

JELLEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. (Ed.). **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, p.357- 381, 1998.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

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.

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

HOIRE, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C. M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law BA, **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC Press; 1999.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

MACKIE, R. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p. 319-326, 2002.

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, 2012.

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. 2011a.

MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 7, p. 1194–1199, 2011b.

MADUREIRA, A. R.; SOARES, J. C.; AMORIM, M.; TAVARES, T.; GOMES, A. M.; PIINTADO, M. M.; MALCATA, F. X. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization

of the content of peptides and organic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1458-1465, 2013.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins – overview on the main biological activities. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197-1211, 2007.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 921–927, 2005.

MARCONI, M. A; LAKATOS, E. M. **Técnicas de Pesquisa**. 5. ed. Editora Atlas: São Paulo, 2002. 282 p.

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.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENO, Y. H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 109–113, 2004.

MATTO, J.; ALAKOMI, H.; VAARI, A.; VIRKAJARVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *subtilis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1029–1037, 2006.

MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N.; GIRÃO, E.S.; PIMENTEL, J.C.M. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte – Teresina: EMBRAPA – CPAMN; Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 177p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde** [resolução na internet]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução- RDC nº 12 e 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União. 02 jan. 2001.

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.

MINERVINI, F.; SIRAGUSA, S.; FACCIA, M.; DAL BELLO, F.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 508-520. 2012.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 5, p.189-197, 2006.

NAIDU, A. S.; CLEMENS, R. A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 431-462.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F., OLIVEIRA, C. E. V., GOMES, A. M. P., PINTADO, M. M. E., MADUREIRA, A. R., CONCEIÇÃO, M. L., EGYPTOQUEIROGA, R. C., SOUZA, E. L., Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

OSMARI, E. K.; CECATO, U.; MACEDO, F. A. F.; SOUZA, N. E. Nutritional quality indices of milk fat from goats on diets supplemented with different roughages. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 128-132, 2011.

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.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, n. 2, p. 4-8. 1974.

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.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361-364, 2001.

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**, v. 2, n. 37, p. 127-135, 2003.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition.**, v. 93, suppl. 1, p. S13-S25, 2005.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science. The european perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6 (suppl.), p. 1660-1664, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÈM, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and Technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 341-347, 1998.

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, 2011.

STANTON, C.; ROSS, R. P. FITZGERALD, G.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198- 203, 2005.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 491-496, 1998.

SOOMRO, A. H.; MASUD T.; ANWAAR, K. Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health - A review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Antimicrobial effects of probiotics bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 10, p. 1916-1926, 2009.

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.

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.

VINE, N. G., LEUKES, W. D., KAISER, H., DAYA, S., BAXTER, J. and Hecht, T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 6, p. 319, 2004.

VIEIRA, K. P.; LEDESMA, M. M.; ROSA, C. M.; HASSEGAWA, R. H.; Contaminação de queijo minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. Universidade Nove de Julho. **Conscientiae Saúde**, v. 7, n. 2, p. 201-206, 2008.

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.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 473-479, 1998.