

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PETIT SUISSE
COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO *Lactobacillus casei***

NELSON DE CARVALHO DELFINO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2013**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PETIT SUISSE
COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO *Lactobacillus casei***

NELSON DE CARVALHO DELFINO

Médico Veterinário

Universidade Federal da Bahia, 2001

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elinalva Maciel Paulo

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA

FEVEREIRO – 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
NELSON DE CARVALHO DELFINO**

Prof^a. Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros-UFRB
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Silva
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Tatiana Pacheco Rodrigues
Universidade Federal

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
FEVEREIRO – 2013**

Dedico este trabalho acima de tudo à Deus
Os meus Filhos Marcelo, Nara, Luna e Laura

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, saúde e perseverança para concluir este trabalho.
À minha orientadora Ludmilla S. S. Barros pela paciência e confiança.
Os meus Filhos Marcelo e Nara pelos incentivos e ajudas dispensadas.
Aos técnicos do laboratório Nilton e Davino pelo apoio ao experimento.
A Tatiane Machado pelo apoio nas bases.
A minhas Filhas Luna e Laura pelos objetivos preexistidos.
À Adriana Balgado pela colaboração na concretização do curso.
Aos Professores da UFBA pelo apoio e orientações.
A todos que de forma direta e indireta contribuíram para este trabalho.

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que sabe, não praticar o que ensina, e não perguntar o que ignora” São Beda

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BGP 93 – Cultura probiótica de cepas puras de *Lactobacillus casei* de origem humana

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

CCS – Contagem de células somáticas

CBT – Contagem bacteriana total

IN – Instrução Normativa

°C – Grau Celsius

h – Hora

BPF – Boas Práticas de Fabricação

APPCC – Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle

% - Porcentagem

pH – Potencial Hidrogênio Iônico

spp – Espécie

et al. – e colaboradores

>- maior

< - menor

n°- Número

°D – Grau Dornic

UHT – *Ultra High Temperature*

RS – Rio Grande do Sul

SP – São Paulo

log – Logaritmo

P= - Correlação de Pearson

DCNTs – Doenças crônicas não transmissíveis

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

LAMASP – Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

BOD – Demanda Biológica de Oxigênio

Caldo LEB – Listeria enriquecimento broth

Caldo MRS – De Man Rogosa e Sharpe

PCA – Agar Contagem Padrão

TSI – Agar Tríplice Açúcar

g – grama

ac. – ácido

g/l – gramas por litro

v/v – volume por volume

>= - maior igual

m/m – massa por massa

m/v – massa por volume

NaOH – Hidróxido de sódio

FIL – Federação Internacional de Laticínios

mL – mililitro

N - Normalidade

Max. – Máximo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

LMR – Limite Máximo de Resíduos

PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produto de Origem Animal

PCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Carne

PCRM - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Mel

PCRL - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Leite

PCRP - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Pescados

IV – quatro

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

LTLT – Low Temperature Long Time

HTST – High Temperature Short Time

Phe – Fenilalanina

Met – Metionina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

UFC – Unidade formadora de Colônia

XX – Vinte

NMP – Número mais provável

® - Marca Registrada

µm - micron

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*

Autor: Nelson de Carvalho Delfino

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: Atualmente, as pesquisas na área de nutrição e saúde têm sido estimuladas pela grande preocupação da população com relação à dieta e saúde. Os alimentos têm como principal função fornecer os nutrientes necessários para uma alimentação balanceada. Além disso, podem beneficiar o organismo, auxiliando na promoção e melhora da saúde, bem-estar e na redução do risco de doenças, como é o caso dos alimentos denominados funcionais. Diversos estudos na área de laticínios, em especial aqueles relacionados ao valor nutritivo dos ingredientes, tem sido incentivado por este crescente interesse da população. A indústria de lácteos tem aplicado conhecimentos das propriedades funcionais e de saúde no desenvolvimento de novos produtos, sendo que estes se tornam cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos. Conseqüentemente, a alimentação de indivíduos com estilo de vida saudável tende a ser, um ato prazeroso e que ao mesmo tempo, visa à saúde e o bem estar. Este trabalho teve por objetivo elaborar um queijo Petit suisse com adição de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus casei* BGP 93, controlando os aspectos de qualidade da matéria-prima e do produto acabado, assim como a enumeração das bactérias probióticas durante o prazo de validade, visando analisar a viabilidade da tecnologia na produção do queijo, as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Os resultados obtidos demonstraram qualidades físico-químicas e microbiológicas satisfatórias e mostrou que o queijo petit suisse pode ser um bom veículo para adição de microrganismo probiótico. O *Lactobacillus casei* se manteve viável durante a vida de prateleira, mesmo com a diminuição do pH. O produto apresenta uma proposta interessante para o mercado de lácteos tendo em vista que os produtos funcionais se relacionam com uma demanda crescente por alimentos.

Palavras-chave: petit suisse, alimento funcional, *Lactobacillus casei*

DEVELOPMENT OF CHEESE PETIT SUISSE ADDED PROBIOTIC

Lactobacillus casei

Author: Nelson de Carvalho Delfino

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: Currently, research on nutrition and health have been encouraged by the great public concern with respect to diet and health. Foods have the main function provide the nutrients necessary for a balanced diet. Furthermore, the body can benefit by assisting in the promotion and improvement of health, well-being and reduction of risk of diseases, such as so-called functional food. Several studies in the area of dairy products, especially those related to the nutritional value of the ingredients, has been encouraged by this growing interest of the population. The dairy industry has applied knowledge of the functional properties and health in developing new products, as they become increasingly challenging, as it seeks to meet consumer demand for products that concomitantly be healthy and attractive. Consequently, the power of individuals with healthy lifestyle tends to be a pleasurable act and at the same time, seeks to health and wellbeing. This study aimed to develop a Petit Suisse cheese with added probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus casei* BGP 93, controlling aspects of quality of the raw material and the finished product, as well as the enumeration of probiotic bacteria during the validity period, aiming examine the feasibility of technology in the production of cheese, the physical chemistry, microbiological and sensory. The results showed physical chemistry and microbiological satisfactory and showed that petit suisse can be a good vehicle for adding probiotic microorganism. The *Lactobacillus casei* remained viable during shelf life even with decreasing pH. The product has an interesting proposal for the dairy market in view of the functional products that are related to an increasing demand for food.

Keywords: petit suisse, functional foods, *Lactobacillus casei*

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS27

Capítulo 1

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE EM PÓ DESNATADO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO.....38

Capítulo 2

PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*59

Capítulo 3

ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*.....86

CONSIDERAÇÕES FINAIS96

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as pesquisas na área de nutrição e saúde têm sido estimuladas pela grande preocupação da população com relação à dieta e saúde. Os alimentos têm como principal função fornecer os nutrientes necessários para uma alimentação balanceada. Além disso, podem beneficiar o organismo, auxiliando na promoção e melhora da saúde, bem-estar e na redução do risco de doenças, como é o caso dos alimentos denominados funcionais.

Assim, o emprego de probióticos em alimentos, associados ou não às terapias já existentes, poderá representar uma estratégia eficiente no combate às infecções que acometem os seres humanos.

Diversos estudos na área de laticínios, em especial aqueles relacionados ao valor nutritivo dos ingredientes, tem sido incentivado por este crescente interesse da população. A indústria de lácteos tem aplicado conhecimentos das propriedades funcionais e de saúde no desenvolvimento de novos produtos.

Uma microbiota intestinal saudável resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas, o que irá assegurar melhoria na qualidade de vida do indivíduo.

Um dos derivados do leite que possui maior valor agregado e destaque no campo econômico é o queijo. Este é altamente nutritivo devido aos seus teores de proteínas, gorduras, cálcio, fósforo e vitaminas, sendo considerado uma das formas mais antigas de conservação do leite.

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos. Conseqüentemente, a alimentação de indivíduos com estilo de vida saudável tende a ser, um ato prazeroso e que ao mesmo tempo, visa à saúde e o bem estar.

Este trabalho teve por objetivo elaborar um queijo Petit suisse com adição de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus casei*, BGP 93¹ controlando os aspectos de qualidade da matéria-prima e do produto acabado, assim como a enumeração das bactérias probióticas durante o prazo de validade, visando avaliar a viabilidade da tecnologia na produção do queijo.

¹ Cultura probiótica de cepas puras de *Lactobacillus casei* de origem humana. As características, probióticas foram testadas pela Universidade de Piacenza in vitro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Entre os produtos alimentícios, o leite e seus derivados são os que apresentam maior crescimento nos últimos anos. O consumidor brasileiro está reaprendendo a comer, e trazendo para seu hábito diário de consumo, iogurtes, leites, queijo tipo “petit suisse”, queijos, e outros (ODILON, 2001).

Apesar de se notar um aumento de consumidores mais conscientes e preocupados com alimentos de qualidade, o comportamento do consumidor de leite é baseado nas suas percepções, que muitas vezes são baseadas em crenças populares e pela opção por produtos com preços mais baratos e não pela real qualidade do produto oferecido (CARVALHO, SANTOS e CARVALHO, 2011).

Com intuito de melhorar a qualidade do leite brasileiro o MAPA, através da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), aprovou os novos regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos leites tipos A, B, C, pasteurizado e leite cru refrigerado, além do regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, sendo que em 29 de dezembro de 2011 o governo criou a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), que suprimiu os leites tipo B e C e escalonou os prazos e limites para redução dos valores de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) até o ano 2016.

A qualidade na indústria de alimentos tem um sentido amplo. No setor de lácteos invariavelmente, aborda a obtenção da matéria-prima e as características dos produtos finais no que se refere a identidade e qualidade do produto, incluindo características organolépticas, padrões microbiológicos e físico-químicos (TEODORO, SILVA e PINTO, 2007).

Muitas vezes a presença de microrganismos é desejável nos alimentos, como para a fabricação de iogurtes e queijos, em que características de textura, sabor e aroma são consequências da fermentação por bactérias lácteas, e também de pães, vinhos e outras bebidas alcoólicas e outras vezes, eles, são

indesejáveis, podendo atuar como agentes de contaminação de alimentos; neste caso são classificados como deterioradores e patogênicos. São várias as fontes de contaminação dos alimentos, dentre elas a água, o ar, o solo, e os utensílios usados na fabricação e os manipuladores de alimentos (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007).

As avaliações microbiológicas aliadas às avaliações físico-químicas indicam a qualidade do leite consumido e utilizado como matéria-prima para produção de derivados lácteos. As provas físico-químicas são indispensáveis e indicam possíveis fraudes e substâncias químicas adulterantes da qualidade do leite. A qualidade microbiológica do leite é um termo muito amplo e genérico. Os principais micro-organismos responsáveis pela contaminação do leite são as bactérias, os vírus, fungos e leveduras. Com relação as bactérias, o leite pode proporcionar o desenvolvimento de dois grandes grupos: os mesófilos e os psicotróficos (ZOCHE et al., 2002) .

2.2. Micro-organismos Mesófilos

As bactérias mesófilas são constituídas por espécies da família Enterobacteriaceae, e dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Estas bactérias são capazes de se multiplicar em temperaturas ótimas na faixa de 30 a 45°C (FORSYTHE, 2005).

Os micro-organismos mesófilos predominam em situações em que as condições básicas de higiene para obtenção do leite são inadequadas e não existe refrigeração. Eles provocam acidificação do leite, pelo acúmulo de ácido láctico resultante da fermentação da lactose, diminuindo, assim, a qualidade do produto mesmo após o tratamento térmico. As bactérias mesófilas possuem a capacidade de se multiplicar em temperatura ambiente e algumas fazem parte da microbiota do leite. A maior fonte de contaminação é o meio ambiente, o manuseio e o transporte até a indústria (LORENZETTI, 2006).

A legislação brasileira através da IN 51 (BRASIL, 2002) preconiza que o leite após a ordenha seja estocado e mantido a temperaturas abaixo de 4°C. Todavia, em muitos casos essa temperatura é ignorada ou o resfriamento é inadequado, favorecendo a multiplicação de micro-organismos mesófilos produtores de

enzimas extracelulares como proteases e lipases que são capazes de deteriorar o leite (BRASIL, 2002; TEBALDI et al., 2008). Desta forma, a refrigeração imediatamente após a ordenha, tem objetivo básico de controlar a multiplicação de micro-organismos aeróbios mesófilos.

As determinações de bactérias mesófilas no leite cru, pasteurizado e derivados lácteos são de grande importância, uma vez que revelam as condições básicas de higiene aplicadas na obtenção do produto, revelando condições de insalubridade (BORGES et al., 2001).

2.3. Coliformes Totais e Termotolerantes

O grupo de coliformes totais é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, representados principalmente pelos gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. A maioria destes gêneros é encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais e conseqüentemente em suas fezes, excetuando-se os gêneros *Serratia* e *Aeromonas* que não constituem gêneros entéricos. Alguns coliformes não entéricos usualmente são encontrados em amostras de plantas e solo (JAY, 2005; MOURA et al., 2010).

De forma geral, os coliformes em condições normais não são por si só patogênicos, embora algumas linhagens possam ser responsáveis por causar diarreias e infecções oportunistas. A característica de fermentar a lactose a temperatura de 35°C por 24-48 h, e produzir ácido e gás é utilizada como base para metodologia de determinação de coliformes (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Um dos indicadores comumente utilizados para verificar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos são as contagens de coliformes que são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de micro-organismos que podem causar toxinfecções nos consumidores (MIRANDOLA, 2006). Altas contagens de coliformes totais sugerem falta de higiene, uma vez que os coliformes totais são encontrados no meio ambiente e os termotolerantes habitam exclusivamente o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (QUINTANA e CARNEIRO, 2006).

Uma vez que a pasteurização destrói facilmente os coliformes, um leite pasteurizado que apresente contagens de coliformes totais ou termotolerantes indica que a contaminação ocorreu após o tratamento térmico (TRONCO, 2008).

A presença de coliformes totais em alimentos não evidencia necessariamente contaminação de origem fecal, todavia sua detecção em alimentos evidencia práticas de higiene inadequadas durante seu processamento que precisam ser revistas para que se possam oferecer alimentos seguros ao consumidor (RANGEL, 2007).

O consumo de um alimento seguro pela população envolve o conhecimento e uso de manipulação adequada, seguindo os princípios de boas praticas de fabricação (BPF). As BPFs englobam os princípios e procedimentos fundamentais necessários à produção de alimentos com qualidade adequada. É fundamental se utilizarem práticas de higiene, em que medidas sanitárias devem ser seguidas e mantidas pelos estabelecimentos, as quais devem ser sempre aplicadas e registradas, sendo pré-requisitos para outros sistemas em especial, a análise de perigos e pontos críticos de controle, o APPCC (LEVINGER, 2005).

2.4. Staphylococcus Aureus

Staphylococcus são bactérias Gram-positivas, pertencentes à família Micrococcaceae, crescem em formato de cocos agrupados semelhantes a cachos de uva, são imóveis, anaeróbios facultativos, com maior crescimento em condições aeróbias, beta hemolíticos, formam colônias pigmentadas e podem crescer em temperaturas que variam de 18 °C a 40 °C (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A produção da toxina do tipo sorológico A é correlacionada com a produção de um fator enzimático que converte o fibrinogênio do plasma em fibrina formando um coágulo. Bactérias que são capazes de coagular o plasma são denominadas de coagulase positiva e muitas delas são patogênicas. Essa característica é importante para identificação fenotípica de isolados da bactéria (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005; LUZ, 2008). Os *Staphylococcus coagulase* positiva significativos para a medicina humana e veterinária estão representados na espécie *Staphylococcus aureus*, que é o mais patogênico dos estafilococos. Sua

virulência está na capacidade de produzir toxinas lesivas (BEER, 1999; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Staphylococcus aureus é um micro-organismo que habita normalmente a mucosa da nasofaringe como microbiota comum sem causar qualquer sintomatologia. Da mucosa pode facilmente contaminar as mãos dos manipuladores e conseqüentemente os alimentos manuseados (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005; LUZ, 2008). Aproximadamente 15% dos adultos saudáveis são portadores assintomáticos desta bactéria (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

O leite é um excelente meio de cultura para o crescimento do *Staphylococcus aureus*, bactéria frequentemente envolvida em surtos de toxinfecções alimentares, embora não se tenha estatísticas precisas no Brasil. No entanto, sabe-se que outras espécies *S. intermedium*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, também são capazes de produzir enterotoxinas (PIRES et. al., 2006; CHAPAVAL et al., 2010).

Este pode ser contaminado com o *Staphylococcus aureus* quando a vaca apresenta mastite, que é a infecção da glândula mamária, uma vez que esta bactéria está associada à maioria dos casos de mastite nos rebanhos leiteiros mundiais e nacionais (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). As infecções mamárias causadas por esta bactéria são de difícil tratamento porque elas invadem o tecido intersticial dificultando ação dos antimicrobianos (BEER, 1999).

Staphylococcus aureus é frequentemente encontrado em queijos e outros produtos de laticínios. É eliminado pela pasteurização; no entanto, sua toxina é termorresistente, sendo, portanto, importante a prevenção do crescimento deste micro-organismo. Boas práticas de fabricação, incluindo higiene de ambiente, funcionários e equipamentos, bem como evitar a recontaminação de produtos processados, enfatizando a manutenção de baixas temperaturas, são medidas eficientes no controle de contaminação e crescimento do micro-organismo (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007).

A ingestão das toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento está relacionada à intoxicação alimentar estafilocócica, representando um risco para a saúde pública, uma vez que esta toxina é termoestável podendo sobreviver até trinta minutos de fervura (STAMFORD et al., 2006).

A toxina é produzida em temperaturas que variam de 10 °C a 45 °C com ponto ótimo de produção de 40 °C a 45 °C; portanto a produção da toxina no leite é uma possibilidade real, uma vez que a temperatura de acondicionamento pós-ordenha é a temperatura ambiente que muitas vezes atinge 30 °C (LUZ, 2008).

Quando ocorre intoxicação, a toxina ativa rapidamente o centro reflexo do vômito, acompanhado de dores abdominais fortes e diarreia. Embora a intoxicação estafilocócica seja debelada em indivíduos saudáveis pode haver complicações em pacientes imunologicamente deprimidos como idosos e crianças podendo levar a morte (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Para prevenir a intoxicação alimentar estafilocócica é fundamental que se adote medidas preventivas sanitárias durante a obtenção da matéria-prima e durante o preparo do alimento bem como a refrigeração imediata em temperaturas inferiores a 6 °C e 7 °C (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

2.5. Salmonella spp.

É um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007). As espécies deste gênero são mesófilas com crescimento em 30°C a 40°C , mas alguns sorotipos são psicotróficos, e crescem em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0), com ótimo entre 6,0 e 7,5. A atividade de água para crescimento varia 0,93 a 0,96, mas podem sobreviver por longo período em alimentos com baixa atividade de água, além disso, podem crescer em concentrações moderadas de cloreto de sódio 3 a 5% (BOPP et al., 2003; D'AOUST et al., 2001).

As espécies de salmonelas têm sido reconhecidas a mais de 100 anos como causadoras de doenças de média severidade, como gastroenterites, e também de alta, como febre tifóide, paratifóide, bacteremia e septicemia e também é responsável por uma variedade de sequelas (BELL e KYRIAKIDES, 2002).

A ampla distribuição de bactérias do gênero de *Salmonella* entre os animais, a existência de portadores assintomáticos, a habilidade de permanecer no ambiente e nos alimentos, são fatores que contribuem para que este patógeno seja o agente etiológico mais frequente em casos de surtos de infecção gastrointestinal veiculada por alimentos em vários países (TESSARI, CARDOSO e CASTRO, 2003; MAIJALA, RANTA e SEUNA, 2005;).

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento e os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de transmissão de *Salmonella spp* (ÁVILA e GALLO, 1996).

Vários pesquisadores detectaram a presença de *Salmonella spp.* em amostra de leite cru e pasteurizado como Padilha et al. (2001), em Recife e Viganò et al. (2007), na Tanzânia. Entretanto, Ávila e Gallo (1996) avaliaram a qualidade de leite cru e pasteurizado comercializado no município de Piracicaba – SP e não encontraram positividade em nenhuma das amostras analisadas de cada tipo de leite.

2.6. Listeria

Listeria monocytogenes é um patógeno que emergiu na década de 80 como um agente causador de doenças veiculadas por alimentos, denominada listeriose, caracterizada por casos de gastroenterite e, principalmente, septicemia, meningite e meningoencefalite, nos casos mais graves. A listeriose acomete preferencialmente os idosos, neonatos, gestantes e pessoas imunodeprimidas. Em pessoas saudáveis, os relatos mais recentes de surtos têm evidenciado casos de gastroenterites (BORGES et al., 2009).

As espécies do gênero são pequenos bastonetes Gram-positivos, não formam esporos e cápsulas, são anaeróbios facultativos, móveis devido à presença de flagelos peritríquios, e, em meio sólidos, a 20-25°C, apresentam mobilidade típica de guarda-chuva (BILLE e ROCOURT, 2003). Crescem numa faixa de temperatura entre -0,4 a 50°C (LOU e YOUSEF, 1999), com crescimento ótimo a 30-37 °C (BILLE e ROCOURT, 2003). A faixa de pH para crescimento situa-se entre 5,6 a 9,6 (SWAMINATHAN, 2001) A atividade de água ótima é >0,97, porém, a mínima varia entre 0,90 – 0,93 (LOU e YOUSEF, 1999). Esses micro-organismos toleram altas concentrações de cloreto de sódio 10-12%. (DONELLY, 2001).

Figueiredo (2000) detectou *Listeria monocytogenes* em leite cru, fresco, refrigerado, e leite pasteurizado na cidade de Fortaleza/CE. Silva et al. (2003) encontraram *L. monocytogenes* em amostras de queijos Minas frescal de duas

indústrias processadoras de queijo. Brito et al. (2008) isolaram *L. monocytogenes* em queijos, equipamentos e utensílios de uma indústria processadora. Silva et al. (2006) detectaram este microrganismo em 26,7% das amostras de queijo minas frescal artesanal produzidas e comercializadas em Pelotas/RS.

2.7. Fungos Filamentosos e Leveduras

Devido sua composição nutricional, o leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, dentre os quais, uma variada gama de leveduras com distintas características biológicas (FLEET, 1990). Em geral, as leveduras são consideradas saprotróficas e muitas espécies têm sido isoladas de tanque de armazenamento de leite oriundas de animais considerados sadios (SPANAMBERG et al., 2004; RUZ-PEREZ et al., 2004).

A presença de fungos filamentosos e leveduras em alimentos indicam produção sob condições de higiene insatisfatórias. Além disso, quando presentes em queijos, por exemplo, esses micro-organismos são os principais responsáveis pela deterioração do produto (FEITOSA et al., 2003), o que ressalta a importância de seu controle, já que a legislação brasileira estabelece limite para bolores e leveduras em queijos de muito alta umidade com adição de bactérias lácticas em forma viável e abundantes (BRASIL, 1996).

Leveduras podem estar presentes ao longo da cadeia produtiva do leite, da fazenda até o produto terminado. Como contaminantes naturais, estão amplamente distribuídos no ambiente da ordenha, estando presentes no leite cru e utensílios (LOPANDIC et al., 2006). Embora o leite cru seja frequentemente contaminado com leveduras, as populações são geralmente baixas, comparadas com a das bactérias, sugerindo que o rápido crescimento das bactérias, restringe o crescimento das leveduras (FLEET, 1990; ROOSITA e FLEET, 1996).

A presença de fungos em alimentos é indesejável, porque estes organismos são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, produzem sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem ser responsáveis pela produção de metabolitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Estes metabolitos recebem a denominação genérica de “micotoxinas”, e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando

ingeridos com os alimentos são responsáveis por alterações biológicas prejudiciais, tanto no homem quanto nos animais (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

2.8. Composição Físico-química do Leite

O leite é uma das mais completas fontes de nutrientes para os seres humanos, por conter componentes como proteínas, vitaminas e sais minerais, importantes para nutrição humana. É também um alimento extremamente perecível, podendo sofrer alterações nas suas características físico-químicas e microbiológicas, tornando-se impróprio para o consumo (PONTES NETTO et al., 2005). Estes componentes podem variar principalmente em função da alimentação animal, espécie, raça, individualidade, tempo de gestação, intervalo entre ordenhas, stress ou ação de medicamentos (GONZÁLEZ, 2001; ALVES, 2006; FERREIRA, 2007).

Diversos pesquisadores encontraram em várias regiões do Brasil, amostras de leite fora dos padrões, o que se verifica a necessidade de constantes levantamentos físico-químicos para a detecção de fraudes e contaminações com a finalidade de garantir a qualidade e minimizar riscos e consequências para a Saúde Pública (GUSMÃO, GONÇALVES e HOFFMANN, 2005).

A mastite é uma das causas de alterações das características físico-químicas do leite. Leites de vacas com mastite apresentam teores de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo menores e teores de cloreto, sódio e células somáticas maiores quando comparados ao leite normal (SANTOS, PRATA e FONSECA, 2001).

Para estabelecer normas quanto às características físico-químicas o MAPA, através da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), estabeleceu os valores mínimos aceitáveis para o leite considerado livre de fraudes ou leite normal que são os seguintes:

- 1) Gordura: mínimo de 3%.
- 2) Acidez:(g ac. Láctico/100 mL) entre 0,14 a 0,18.
- 3) Densidade a 15°C: entre 1028 e 1034 g/L.
- 4) Extrato seco desengordurado: mínimo de 8,4%.
- 5) Índice crioscópico máximo: - 0,512°C
- 6) Índice de refração do soro cúprico a 20°C – mínimo 37° ZEISS

7) Estabilidade ao alizarol 72% (v/v) - estável

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, onde fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos, e que não tem merecido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (MALLET et al., 2007).

2.8.1 Desidratação do leite

Entende-se por leite em pó o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado, ou parcialmente desnatado e apto para alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1996). A legislação ainda preconiza que o leite em pó pode ser classificado em relação ao teor de matéria gorda em: integral (\geq a 26%), parcialmente desnatado (entre 1,5 a 25,9%), e desnatado ($<$ 1,5%) e que deve apresentar os seguintes requisitos (Tabela 1).

Tabela 1. Requisitos preconizados pela Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 para leite em pó integral, parcialmente desnatado e desnatado.

Requisitos	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado	Métodos de Análises
Matéria gorda (%m/m)	\geq 26,0	1,5 a 25,9	$<$ 1,5	FIL 9C: 1987
Umidade (%m/m)	Max. 3,5	Max. 4,0	Max. 4,0	FIL 26: 1982
Acidez titulável (mL de NaOH N/10 g sólidos não gordurosos)	Max. 18,0	Max. 18,0	Max. 18,0	FIL 86: 1981
Índice de solubilidade (mL)	Max. 1,0	Max. 1,0	Max. 1,0	FIL 129 ^a : 1988

Fonte: BRASIL 1996

O leite em pó como produto resultante da desidratação total do leite é considerado de vida útil longa, o que permite amenizar problemas de sazonalidade na produção de leite facilitando o sistema de comercialização e tornando o transporte mais econômico, pois neste caso o volume é grandemente reduzido pela remoção da água (BRASIL, 2001; PONTES et al., 2006).

O conteúdo de nutrientes no leite em pó depende das perdas durante o processo de concentração, além das que são originadas durante a dessecação. A composição em aminoácidos das proteínas permanece relativamente constante durante a dessecação e instantaneização (VARNAM e SUTHERLAND, 1995)

As propriedades funcionais das proteínas do leite em pó incluem absorção e a retenção de água, a formação de espuma, emulsificação, solubilidade, viscosidade, gelatinização, estabilidade térmica e coloidal (SILVA, 2009).

2.9 Resíduos de Antimicrobianos em Leite

O termo antibiótico (do grego = contra e bios = vida) foi introduzido por Selman Abraham Waksman, biólogo russo naturalizado americano nascido em 1888, definindo substâncias químicas produzidas por microrganismos, e que em pequenas doses inibe o crescimento ou causam a morte de fungos ou bactérias. Poul Ehrlich (1854 – 1915) em seus estudos iniciou o emprego de antimicrobianos específicos, observando que corantes orgânicos podiam exercer efeito tóxico em alguns agentes causadores de infecções (SPINOSA, 1996; WALSH, 2003).

A descoberta da antibióticoterapia revolucionou a terapêutica. Doenças que acometiam por muitos anos a humanidade (lepra, sífilis, tuberculose) foram controladas e debeladas (SILVA, 2006).

A penicilina foi descoberta em 1928 por Fleming (pesquisador de Londres). No meio de cultura em que ele havia semeado *Staphylococcus aureus*, ocorreu contaminação acidental por esporos do fungo *Penicillium notatum* causando lise ao seu redor (KENNEDY, 2004).

Domagk em 1935, sintetizou o prontossil, a primeira sulfa com possibilidade de uso terapêutico, comprovando seus efeitos e resultados em uma doença de pele denominada erisipela, o que lhe valeu o Premio Nobel de Medicina três anos depois (BARROS, 2010).

Na década de 1940, Waksam et al. realizaram estudos com actinomicetos como fonte de antibióticos e em 1944 descobriram a estreptomicina. Esse grupo de micróbios demonstrou ser uma fonte de antibióticos, e assim foram descobertas as tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, entre outros (SILVA, 2006).

Com o desenvolvimento da antibioticoterapia, notadamente após a 2ª guerra mundial, os antibióticos passaram a ser muito utilizados na pecuária para o tratamento das enfermidades infecciosas, como fator de crescimento nas dietas e também como conservantes dos alimentos (SOUZA e BENEDET, 2000).

A presença de antibióticos no leite pode causar hipersensibilidade em humanos, além de resistência a antibioticoterapia (FONSECA e SANTOS, 2000).

É cada vez maior o número de pessoas sensíveis às penicilinas, entretanto outros antibióticos como tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas e derivados dos nitrofuranos também causam hipersensibilidade em menor extensão. As reações geralmente se manifestam como reações dermatológicas (urticárias e dermatites) e/ou sintomas envolvendo o sistema respiratório (rinite e asma brônquica) (PRODAP, 2012).

Os riscos à saúde do consumidor pela presença de resíduos de antibióticos nos alimentos podem ser de três categorias: farmacológicos e toxicológicos; microbiológico (favorecimento de resistência de micro-organismos patogênicos na microbiota intestinal); e risco imunopatológicos, como alergias (FONSECA e SANTOS, 2000; SOUZA, 2012).

Os principais aspectos toxicológicos dos resíduos de antimicrobianos no leite estão ligados às ações carcinogênicas ou mutagênicas, no caso do cloranfenicol, nitrofuranos e as sulfonamidas, que acometem o DNA celular com danos irreversíveis (PRODAP, 2012).

Os níveis de exposição a estas substâncias são muito baixos e o aparecimento de efeitos tóxicos geralmente é tardio. A toxicidade dos contaminantes alimentares e seus efeitos se dão principalmente em longo prazo. A contínua exposição do indivíduo aos resíduos de antibióticos pode levar a um aumento da resistência das bactérias, seja pela transferência de bactérias resistentes por via da alimentação, ou pela transferência do fator de resistência (fator-R) de bactérias não patogênicas resistentes a outras bactérias (ANIL, 2012).

Para gestantes o risco do consumo do leite contendo resíduos de antibióticos é grande pois alguns antimicrobianos têm potencial teratogênico (metronidazóis, rifampicina e trimetropim), e outros como a estreptomicina apresentam ototoxicidade, as tetraciclinas podem levar a alterações no desenvolvimento ósseo fetal (NASCIMENTO, MAESTRO e CAMPOS, 2001).

Resíduos de antibióticos no leite interferem na produção de derivados fermentados, além de interferir com o teste de redutase (BRITO e PORTUGAL, 2003). Esses resíduos causam inibição das culturas lácteas utilizadas na elaboração de produtos fermentados como o iogurte, leites fermentados, manteiga e queijo (ANIL, 2012).

A presença de resíduos de antibióticos poderá inibir as bactérias lactofermentadoras, e não afetar a maior parte das bactérias indesejáveis, como colibacilos entre outros, dificultando o seu pleno aproveitamento industrial (SOUZA e BENEDET, 2000; NASCIMENTO, MAESTRO e CAMPOS, 2001).

Outros problemas são formação de odores desagradáveis na manteiga e no creme. A pasteurização do leite tem pouco ou nenhum efeito sobre os resíduos de antibióticos (EMBRAPA, 2012).

O número 1 do Artigo 1º do Regulamento (CEE) N°315/93 do Conselho de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos para os contaminantes presentes nos alimentos, define contaminante como qualquer substância que não seja propositalmente adicionada a um gênero alimentício mas esteja presente como resíduo da produção (incluindo tratamentos aplicados ao gado) (EUR-LEX, 2012).

A mastite é a principal doença do gado leiteiro que requer antibioticoterapia e é uma das principais origens de resíduos no leite. Entretanto qualquer antibiótico utilizado em vacas por qualquer via de administração (intramamária, intramuscular, oral, dieta ou pele) pode acarretar resíduos no leite (DAIRY, 2012).

O grau de absorção, a disposição e a toxicidade dos contaminantes alimentares é determinado por vários fatores, incluindo hábitos alimentares, idade, sexo, especificação dos fatores alimentares, como as gorduras, proteínas e os minerais (ANIL, 2012).

O Codex Alimentarius é uma organização internacional para a execução de programas conjuntos formada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Foi criada em 1962 com o objetivo de proteger a saúde do consumidor e a promoção do comércio internacional de alimentos. O Comitê de Resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos, do Codex Alimentarius, criado em 1987, determina os limites máximos de resíduos de substâncias veterinárias permitidos nos alimentos de origem animal (LMR). Os limites não são

mandatários, mas são estabelecidos como o padrão para negociações comerciais (FONSECA e SANTOS, 2000; FAO/OMS, 2013).

Em 2001 foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos - PAMvet. Na implantação do programa, o leite foi eleito como primeiro alimento a ser pesquisado, com base nos dados do IBGE, nos quais o leite é a proteína de origem animal mais consumido pela população brasileira (BRASIL, 2000, 2001).

A Instrução Normativa SDA n.º 42, de 20 de dezembro de 1999, altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado- PCRP. Este plano constitui uma ferramenta de “gerenciamento de risco” com o objetivo precípua de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas (BRASIL, 1999).

A Instrução Normativa n.º 51, no anexo IV, estabelece que é proibida a presença de resíduos de antibióticos, e outros agentes inibidores do crescimento microbiano no leite (BRASIL, 2002).

2.10. Pasteurização

Por sua composição físico-química e microbiológica, o leite é um produto alimentar altamente perecível. Um dos cuidados, logo após sua obtenção, deve ser submetê-lo, o mais rápido possível, a algum processo que evite a multiplicação de micro-organismos nele existentes (TRONCO, 2008).

O aspecto mais relevante do processo é o tratamento térmico. Este foi ajustado, já a muitos anos, de acordo com os parâmetros térmicos de uma das bactérias patogênicas não esporuladas mais termorresistente, a *Mycobacterium tuberculosis*, e a termoestabilidade da fosfatase alcalina; esta enzima é desativada a 71,7°C durante 15 segundos. Existem dois micro-organismos, a *Coxiella burnetti* e a *Listeria monocytogenes* um pouco mais termorresistentes que o *M. tuberculosis*. Em 1966, a Organização Mundial da Saúde indicou que, nas áreas geográficas onde a *C. burnetti* fosse endêmica, bastaria aumentar a temperatura em dois graus para assegurar a ausência desse micro-organismo no leite pasteurizado (ORDONEZ et al., 2007).

De acordo com o Artigo 157 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por pasteurização o emprego conveniente do calor, com o fim de destruir totalmente a flora microbiana, sem alteração sensível da constituição física e equilíbrio químico do leite e sem prejuízo de seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais (BRASIL, 1997).

Os tratamentos térmicos aplicados na pasteurização dividem-se classicamente em: pasteurização baixa, lenta, descontínua ou LTLT (Low Temperature Long Time); e pasteurização alta, contínua, rápida, em placas, conhecida como HTST (High Temperature Short Time). Na pasteurização baixa, utilizam-se temperaturas de 62,7-63°C a 65°C durante 30 minutos. Em geral, pode ser efetuada em tanques com camisa de vapor, onde, logo após o tratamento, circule água fria e gelada para posterior resfriamento. A pasteurização rápida utiliza os pasteurizadores de placas, o leite é aquecido a 72-75°C durante 15-20 segundos (BRASIL, 2002; MONTEIRO, PIRES e ARAÚJO, 2007).

As temperaturas de pasteurização do leite são suficientes para destruir, além dos organismos patogênicos, todas as leveduras, todos os fungos, todas as bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, além disso, durante o processo ocorre desnaturação parcial ou total de enzimas, vitaminas, desnaturação parcial de proteínas do soro, insolubilização de sais, entre outros efeitos (TRONCO, 2008).

A pasteurização não é um processo para recuperar um leite de má qualidade, mas um tratamento para prolongar a conservação do leite, sem alterar suas propriedades organolépticas, físicas e nutritivas. É também uma forma de proteger a saúde do consumidor, porque destrói os micro-organismos transmissores de doenças, que em determinadas circunstâncias podem estar presentes no leite e aqueles que inferiorizam a qualidade dos produtos derivados do leite (SBRT, 2012).

2.11 Produção do Queijo Petit Suisse

Entende-se por queijo “petit suisse”, o queijo fresco, não maturado, obtido por coagulação do leite com coalho e/ou enzimas específicas e/ou bactérias específicas, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias (BRASIL,

2000). É feito com leite fresco pasteurizado ou reconstituído, adicionado de creme de leite para elevar o teor de gordura a 60 – 70 %, fermentados por culturas lácticas mesófilas, sendo a base do produto, devendo apresentar sabor suave e adocicado além de consistência macia (LAROUSSE, 1995).

No Brasil, este queijo é fabricado industrialmente por centrifugação da coalhada, para separação do soro, obtendo-se o queijo “quark”, que é utilizado como base para o queijo petit suisse, adicionando-se polpa de fruta, açúcar e gordura. É consumido como sobremesa e dirigido principalmente ao público infantil. Tem boa aceitação e público crescente de consumo, embora tais índices ainda sejam pequenos, quando comparado aos de outros países (VEIGA et al., 2000).

Veiga e Viotto (2001) elaboraram um queijo petit suisse utilizando ultrafiltração em membrana tubular cerâmica de 0,08 μ m com a finalidade de analisar a influência de diferentes tratamentos térmicos no leite, sobre o fluxo, o coeficiente de retenção proteico, o coeficiente de retenção de cálcio e o rendimento proteico. Os resultados obtidos não foram significativos em relação ao efeito do tratamento térmico na retenção de proteína e cálcio e no rendimento proteico.

Silva, Guerino e Drunkler (2003) fabricaram queijo petit-suisse adicionando ao leite vários percentuais de soro (10, 30 e 50 %) e observaram que o soro de leite adicionado não interferiu nas características sensoriais, quanto à aceitação e sabor, inclusive favorecendo a textura, quando empregado na proporção de 10% de soro.

Na fabricação de queijo petit-suisse utiliza-se os seguintes ingredientes: cloreto de cálcio, coalho e fermentos lácteos (MARTINS, 2000). Após a coagulação realiza-se a dessoragem, sendo que esta etapa contribui para a diminuição do rendimento. Uma das formas de aumentar o rendimento é a utilização de aditivos, tais como os hidrocolóides, com o intuito de reter o soro. Estes podem interagir com as proteínas do leite, gerando um produto final com estabilidade e consistência diferenciada (GLICKSMAN, 1986). A produção do queijo petit suisse com retenção do soro pode representar uma grande vantagem dentro dos programas de redução de resíduos das indústrias de laticínios do país e também para o aproveitamento total dos nutrientes contidos.

2.11.1 Cloreto de cálcio.

Essa substância é adicionada com a finalidade de repor parte dos sais de cálcio que foi precipitado pelo tratamento térmico da pasteurização. A presença do cálcio solúvel é indispensável para que a coagulação ocorra. Ele também melhora as propriedades da coalhada aumentando a sua firmeza, em virtude da melhor capacidade de expulsão do soro (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007).

O cloreto de cálcio quando em excesso pode ocasionar a formação de sabor amargo e sua insuficiência pode resultar na formação de uma coalhada débil com perdas econômicas. O leite natural possui cálcio suficiente para uma boa coagulação razão pela qual se adiciona o cloreto somente em leite pasteurizado. O cloreto de cálcio proporciona a formação de uma coalhada compacta, evita a perda de sólidos no soro, diminui o tempo de coagulação e facilita a expulsão do soro (MATTOS et al., 2010).

O cloreto de cálcio diminui a perda de gordura no soro e melhora a liga na massa devido a sua propriedade de formar pontes de ligação na massa; obtendo assim uma coalhada mais rápida e mais firme, melhorando o rendimento de fabricação. Durante a pasteurização do leite, parte do cálcio ligado à proteína é reduzido afetando diretamente a formação de uma adequada coalhada. Para correção deste problema é necessária a adição de cálcio sob a forma de cloreto de cálcio, em solução aquosa na dosagem de 40 a 50 mL para cada 100 litros de leite pasteurizado (MARTINS, 2000).

2.11.2 Enzima (coalho)

O coalho é uma substância originalmente extraída do estômago de alguns mamíferos como bezerros e cabrito em fase de amamentação, sendo atualmente também sintetizado por alguns micro-organismos (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007). Com a finalidade de atender grupos especiais como os vegetarianos e os muçulmanos, foram criados coalhos de origem vegetal e microbiana. Coalhos de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos fabricados com eles costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo de estocagem. Já os coalhos de origem bacteriana têm características bastante similares aos de origem animal (PERRY, 2004).

A função do coalho, utilizado em todos os tipos de queijo exceto os frescos tipo "cottage", é coagular a caseína presente no leite. A principal enzima responsável por essa ação é a renina, uma fosfoproteína de ação proteolítica. Ela atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em para-caseína que precipita em presença de íons Ca^{2+} formando, então a coalhada. Este processo é dependente da temperatura, do pH e do teor de cálcio do leite. A temperatura ótima de ação do coalho é em torno de 40 °C, mas costuma-se utilizar temperaturas ligeiramente mais baixas (em torno de 35 °C) para evitar que a coalhada fique muito dura. Outro método de coagulação da caseína é adicionar ácido ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Neste pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam (MARUYAMA, et al., 2006).

A quimosina, outra enzima do coalho, promove uma proteólise específica sobre a k-caseína na ligação peptídica Phe105 – Met106, formando dois segmentos 01 a 105 – para – k-caseína (que é insolúvel na presença de cálcio e passa a fazer parte da estrutura do coágulo) e 106 a 169 – caseinomacropéptido (solúvel na presença de cálcio, sendo perdido no soro) (SILVA et al. 1995).

A ação do coalho não termina após o corte da coalhada, ele continua atuando na maturação na forma de reação chamada proteólise, que atua na quebra da molécula de caseína, formando compostos amargos (peptona) e não amargos. O fermento quebra a peptona para aminoácido. Portanto com o passar do tempo o queijo vai modificando aos poucos sua consistência e seu sabor (MARTINS, 2000).

2.11.3 Fermento láctico

O fermento láctico é constituído por bactérias lácticas que fermentam, principalmente, a lactose, sendo o produto dessa fermentação o ácido láctico. Essas bactérias são responsáveis pelo desenvolvimento da acidez e pela formação de sabor característico e acentuado e também apresentam como vantagem a inibição de micro-organismos contaminantes no queijo, devido à redução ocorrida no pH (MONTEIRO, PIRES e ARAUJO, 2007).

Entre os *Lactobacillus* usados extensivamente na indústria de alimentos, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tem sido usado principalmente como

cultura starter de queijos, bem como para fermentação em larga escala de leite em associações com *Streptococcus thermophilus* (VIEGAS, 2008). As propriedades associadas à ação do *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são a de deter o crescimento descontrolado de leveduras (*Candida* sp.) do intestino delgado ao grosso e a de auxiliar e estimular a regularidade do mesmo. Também atua na produção de lactase, a enzima responsável pela quebra da molécula da lactose no trato digestivo, e, portanto é útil para os que são intolerantes à lactose. Produz um ambiente intestinal ácido (ácido láctico) que inibe fortemente os micro-organismos indesejáveis. Não é uma bactéria colonizadora, mas contribui para o crescimento e a viabilidade dos micro-organismos residentes benéficos (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* etc.), apoiando seu crescimento e sua atividade (SAAD, 2006).

O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* contribui no processo de digestão de carboidratos complexos e proteínas pelo organismo. De natureza proteolítica, pode facilmente quebrar proteínas, ampliando a biodisponibilidade de minerais, especialmente o cálcio. A absorção é duplamente importante em indivíduos intolerantes à lactose que podem também estar sofrendo de deficiência de cálcio dietético. Pode também produzir substâncias antimicrobianas antagonistas a vários micro-organismos nocivos (SAAD, 2006).

2.12 Probióticos

O termo probiótico, de origem grega, significa “para a vida” e é utilizado para designar a presença em alimentos de bactérias benéficas para o organismo humano. O conceito de probióticos provavelmente evoluiu a partir de uma primeira teoria proposta pelo cientista russo Elie Metchnikoff, que observou que o consumo de leites fermentados poderia reverter efeitos putrefativos da microbiota intestinal (STANTON et al., 2005). Já Fuller (1989), definiu probiótico como suplemento alimentar composto de células microbianas vivas, as quais têm efeitos benéficos para o hospedeiro, por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano do intestino.

Alimentos contendo bactérias probióticas são considerados alimentos funcionais e estão ganhando popularidade e aceitação em todo o mundo (ONG, HENRIKSSON e SHAH, 2006). Um alimento funcional tem sido definido como

qualquer alimento modificado ou ingrediente alimentar que possa proporcionar benefícios à saúde que vão além dos nutrientes tradicionais que o contém (FERGUSON, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA regulamentou os Alimentos Funcionais através das seguintes resoluções: ANVISA/MS 16/99a; ANVISA/MS 17/99b; ANVISA/MS 18/99c, ANVISA/MS 19/99d. A Resolução Nº 19 de 30 de Abril de 1999 da ANVISA define que: Alegação de propriedade funcional: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

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 sítio de adesão 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).

Os probióticos, quando ingeridos, em determinado número, atuam sobre a microbiota nativa, controlando o colesterol, as diarreias e reduzindo o risco de câncer, além de atuar na inibição das bactérias patogênicas. Os probióticos estimulam a reprodução de bactérias benéficas ao organismo. Sua função é manter os mecanismos de proteção e prevenir distúrbios gastrointestinais (BUENO, 2005).

Quanto ao efeito dos probióticos na função imunológica, há evidência de que podem estimular tanto a resposta específica quanto a inespecífica. Esses efeitos são mediados pelo aumento nos níveis de citocinas, pela ativação de macrófagos e pelo aumento da concentração de imunoglobulinas. Há evidências ainda de que produtos lácticos fermentados, que contém cepas e níveis adequados de bactérias ácido-lácticas, podem ser uma boa maneira de incorporar tais produtos e seus nutrientes a dietas de indivíduos intolerantes a lactose (CUPPARI, 2005).

Células dos probióticos devem ser veiculadas em produtos selecionados que sejam de fácil aceitação pelo consumidor, nos quais o micro-organismo seja conservado na forma viável. Leites e derivados, por ocuparem grande fatia do

mercado brasileiro, oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético. 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).

A sobrevivência e a viabilidade celular das bactérias probióticas são dependentes da espécie e da tecnologia de produção e por isso é comum a utilização de duas bactérias para a fermentação de um substrato; uma bactéria suporte e outra probiótica. A bactéria suporte tem a função de dar corpo ao produto pela síntese de exopolissacarídeos, e também a de promover o crescimento das bactérias probióticas, baixando o pH e estimulando seu crescimento (BADARÓ et al., 2009).

Segundo Suda et al. (2009) não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo do tempo nas contagens do *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* UFV H2B20 durante a estocagem, do queijo Quark (que é a base do queijo petit suisse) sugerindo que o produto é um bom veículo para micro-organismos probióticos além de se relacionar com uma tendência mundial do mercado lácteo que é a utilização de ingredientes funcionais.

Devido a preocupação dos consumidores com relação às questões de saúde, a indústria de alimentos funcionais tem explorado, cada vez mais, novos processos e aumentado a diversidade de produtos alimentares disponíveis para o consumo humano (MICHIDA et al., 2006). Estimativas recentes indicam que o mercado de alimentos funcionais apresentou um crescimento global significativo, movimentando cerca de 50 bilhões de dólares anualmente, além disso, é responsável por mais da metade dos investimentos publicitários na área alimentícia, e possui expectativas de crescimento da ordem de 5% ao ano (HARDY, 2000; STANTON et al., 2005).

Dentre os produtos alimentícios probióticos mais importantes existentes, atualmente, para o consumo humano estão os produtos lácteos, como o leite fermentado, iogurte, leite (Ex: leite *sweet acidophilus*), sobremesas e queijos (SAARELA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002). Esses produtos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do microrganismo para serem considerados probióticos, como, por exemplo, conter pelo menos 10^7 UFC/g de bactérias probióticas viáveis durante todo o período de

vida de prateleira do produto. Esta é uma concentração recomendada por alguns autores (RYBKA e FLEET, 1997; VINDEROLA e RENHEIMER, 2000). Entretanto, vários trabalhos propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 e 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE e SALMINEN, 1995; BLANCHETTE et al., 1996; HOIER et al., 1999).

Além de boa viabilidade no intestino, as propriedades tecnológicas são pré-requisitos para a utilização potencial de culturas probióticas em queijos (KASK et al., 2003).

De maneira geral, existe uma preferência em se incorporar culturas probióticas em produtos lácteos, pelo fato de que a tecnologia empregada nestes produtos tem sido otimizada ao longo do tempo para garantir a viabilidade dos micro-organismos envolvidos no processo produtivo. Desta forma se pretende definir uma tecnologia viável para a manutenção da população de *Lactobacillus casei* no queijo petit suisse, conferindo ao produto qualidades probióticas e funcionais (GONÇALVES, 2012).

2.12.1 *Lactobacillus casei*

As bactérias lácticas são micro-organismos Gram-positivos, não esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, porém aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (HOLZAPFEL et al., 2001). O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares (AXELSSON, 2004). Porém, exceções desta descrição geral ocorrem devido a algumas espécies poderem formar catalase ou citocromos em meio contendo hematina ou compostos relacionados. A produção de uma catalase não-heme, denominada pseudocatalase, por alguns lactobacilos também causa alguma confusão na identificação de bactérias lácticas (HOLZAPFEL et al., 2001).

As primeiras definições de bactérias lácticas baseavam-se na capacidade de fermentação e coagulação do leite por esse grupo de micro-organismos, incluindo também os coliformes. A descrição de *Lactobacillus* por Beijerinck em 1901 como bactérias Gram-positivas separou os coliformes das bactérias lácticas (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

O interesse pela presença dos lactobacilos na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff – Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses micro-organismos para a bacterioprevenção e bacterioterapia (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; STILES e HOLZAPFEL, 1997).

Dentre as bactérias lácticas, o grupo *Lactobacillus casei* compreende aquelas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. São importantes nesse grupo os lactobacilos típicos do hospedeiro humano os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL et al., 2001; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

Os produtos lácteos podem ser considerados como naturalmente funcionais tendo em vista seu comprovado efeito na dieta em geral, com especial destaque para os leites fermentados. Os alimentos funcionais atuam modulando e ativando os componentes celulares e seus mediadores químicos de modo a aumentar a efetividade da ação do sistema imune contra os diversos tipos de antígenos, evitando que estes se instalem e provoquem alterações patológicas no organismo (FURTADO, 2003).

Nos seres humanos, os organismos do gênero *Lactobacillus* são mais comumente usados como probióticos, quer como uma única espécie, ou em culturas mistas com outras bactérias (MALDONADO GALDEANO e PERDIGÓN, 2006).

Há registros de que *L. casei* é a bactéria probiótica mais utilizada na produção de leites fermentados e de outros alimentos lácteos devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após sua ingestão garantindo efeito benéfico ao indivíduo que o consumiu (NOVAK et al., 2001).

Os probióticos são conceituados como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (FAO, 2013). O reconhecimento dos alimentos contendo probióticos como alimentos funcionais que promovem benefícios além da nutrição básica inerente e as emergentes evidências para seu potencial na prevenção de doenças têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos (PATRIGNANI et al., 2006; PHILLIPS, KAILASAPATH e TRAN, 2006).

Os efeitos benéficos atribuídos aos micro-organismos probióticos têm sido alcançados principalmente através da modulação da população e atividade da

microbiota intestinal (YEUNG et al., 2002). As espécies *Lactobacillus casei/paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* constituem uma fração substancial da microbiota constituída por *Lactobacillus* spp. na mucosa intestinal humana (VÁSQUEZ et al., 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Cristiane. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ANIL. Segurança alimentar. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite. Disponível em: <<http://www.agroportal.pt/a/2002/anil.htm>>. Acesso em 30 de jun. de 2012.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados no município de Piracicaba – SP. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 53, n.1, p. 159 – 163., jan/abr, 1996.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A: editors. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker; 2004 3rd ed.. p.1-66, 2004.

BADARÓ A. C. L.; GUTTIERRES A. P. M.; REZENDE A. C. V.; STRINGHETA P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana. *nutrir gerais* **Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga, v. 3, n. 4, p. 396-416, fev./jul. 2009.

BARROS, H. M. T. 1968 a 2008: 40 anos de história recente dos medicamentos. In: Guilhermano, L.G. et al. **Paginas da História da Medicina**. Porto Alegre: Edipucrs, 2010. p. 54 – 64. 2010.

BEER, J. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Rocca, 1999, 380p.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Salmonella*, In: BLACKBURN, C.W.; McCLURE, P.J. **Foodborne Pathogens (Hazards, risk analysis and control)**. Cambridge: CRC Press, 2002. P. 307-335. 2002.

BILLE, J.; ROCOURT, J. *Listeria and Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, chap. 33, p. 461-471, 2003.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.8-15, 1996.

BOPP, A. C.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichiacoli, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, cap. 42, p. 654-671. 2003.

BORGES, G. T.; et al. Contagem padrão de bactérias mesófilas e psicrotóricas em leites cru. **XXVIII Congresso de Medicina Veterinária**. Anais, 2001.

BORGES, M.F.; ANDRADE, A.P.C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. **Listeria monocytogenes em Leite e Produtos Lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009, 31 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 146 de 07 de mar de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PNCRC; **Instrução Normativa**, DAS n.42 de 20 de dezembro de 1999. Brasília, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo petit-suisse. **Instrução Normativa**, n.º53 de 29 de dezembro de 2000. Brasília., 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. . Brasília 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.51 de 18 de setembro de 2002. Brasília. 95p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.62 de 29 de dezembro de 2011. Brasília. 95p.

BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. A. B. Detecção de resíduos de antibióticos em leite – Testes disponíveis e considerações. In: CERQUEIRA, M. M. O. P. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos**. Minas Gerais: Embrapa gado de leite, 2003. 11 p. p.77 – 87. 2003.

BRITO, J. R.; et al.. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, D. C., v. 74, n.15, p. 4954-4961, Aug, 2008.

BUENO, L. M. C. Leite de cabra – excelente alimento funcional. **Leite e Derivados**. São Paulo v.14, n.83, p.52-60, 2005.

CARVALHO, D.; SANTOS, A. C.; CARVALHO, T. B. **Qualidade do leite: uma abordagem sobre a percepção dos consumidores**. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/2/778>. Acesso: 27 dez. 2011.

CHAPAVAL, Lea, MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M.; NASSU, R. T. Efeito da temperatura sobre a produção de enterotoxina estafilocócica em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 24, p.180-181, jan./fev., 2010.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto**. 2. ed. Barueri: Manole, 2005. 474 p.

DAIRY SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGY. **Inhibitors in milk**. Disponível em : <<http://www.dairyscience.info/inhibitors.htm>>. Acesso em 06 de fevereiro de 2012.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.) **Food microbiology**, fundamentals and frontiers 2. ed. Washington: ASM, 2001. Cap. 18, p. 383-409. 2001.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J. R.(Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2001. v. 1, chap. 10,p. 213-246. 2001.

EMPRAPA GADO DE LEITE. Pesquisa de antibióticos no leite: um problema que tem solução. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/jornaleite/artigo.php?id=20>>. Acesso em 07 de jun. de 2012.

EUR-LEX. Regulamento (CEE) nº 315/93 do Conselho, de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. Disponível em: <<http://eur->

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993R0315:PT:HTML>. Acesso em 29 de março de 2012.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/OMS – Organização Mundial da Saúde. Programa Internacional de Segurança Química. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications/WHO_EHC_19_eng_summary_por.PDFAcesso em 17 de janeiro de 2013.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* e suas implicações em Saúde Pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul./ago., 2004.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Suplemento v.23, p.162-165, 2003.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, n.3 p. 452-458, mar 2009.

FERREIRA, M. A. Controle de Qualidade físico-químico em leite fluído. **Dossiê Técnico**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília, 2007.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeriae* avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C**. 2000. 100 p.Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FLEET, G. H. Yeast in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p.199-211,1990.

FONSECA, L. F. L. de; SANTOS, M. V. dos. Resíduos de antibióticos e qualidade do leite. In:_____.**Qualidade do leite e controle da mastite**. Lemos editorial, 2000. Cap. 16. p. 169-175.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001 [cited 2005 Dec 15]. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acesso

FORSYTHE, Steve J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005. 424 p.

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

FULLER, F. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied of Nutrition**, v.66, p. 365-38, 1989.

FURTADO, M. A. M. Lácteos nutracêuticos o conceito de alimento funcional aplicado a produtos de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.58, n. 335, Nov/Dez, p. 37-41, 2003.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. Boca Raton: CRC, 1986. V.3.

GONÇALVES, M. M. **Desenvolvimento de queijo tipo quark simbiótico**. Disponível em; <revistalaticinio.com.br> Acesso em 30 de dezembro de 2012.

GONZALEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação.In:_____. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, p. 5-22.

GUSMÃO, V. V.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado A, B e C obtido do comércio varejista da região de São José do Rio Preto. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.137, p. 95-100, nov./ dez., 2005.

HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, v.16, p.688-697, 2000.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures.In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. p.99-131.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr**. 2001; 73 (2) Suppl:365S-373S. 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre-and probiotics. **Food Res Int**. 2002; 35 (2-3): 109-116. 2002.

JAY, J. M.; **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Arned, 2005.711p.
KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F.K.; MØLLER, P.L.; ARDÖ,Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L.curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v.36, p.1037-1046, 2003.

KENNEDY, M. **A briel history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project**. Califórnia: Asklepiad Press, 2004.

LAROUSSE, **Grande Enciclopédia Cultural Petit Suisse**, v.19, 1995

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

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v.26, p.170-178, 2005.

LOPANDIC, K., et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques, **Food Microbiology**, v.23, n.4, p. 341-350, jun. 2006.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrófilos no leite cru de dois estados da região Sul**. 2006. 71f. Dissertação. (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: M. Dekker. 1999. chap. 6, p. 131-224.

LUZ, I. da S. **Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Argemir Magalhães, Recife, 2008.

MAIJALA R, RANTA J, SEUNA E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**; v.16, n.8, p: 669-675, 2005.

MALDONADO GALDEANO, C.; PERDIGÓN, G. The probiotic bacterium *L. casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity, **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 2 p. 219-226, 2006.

MALLET, A.; da Silva, B. B.; de ABREU L.R.; PICCOLI, R.H. Qualidade microbiológica da água utilizada em pequenas propriedades leiteiras na região de Lavras-MG. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n.357, p.489-496, 2007.

MARTINS, E. **Manual técnico na arte e princípios da fabricação de queijos**. Paraná: Gráfica e Editora Campana Ltda.. 2000. 101 p.

MARUYAMA, L.Y. et al. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia Alimentos**. Campinas, v.26, n.2 abr/jun, 2006.

MATTOS, I.A.F. et al. Efeito do uso do cloreto de cálcio nos aspectos sensoriais do queijo Minas frescal. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer. Goiânia, v.6, n.10, p 1-4, 2010.

MICHIDA, H.; TAMALAMPUDI, S.; PANDIELLA, S.S., WEBB, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, p.73-78, 2006.

MIRANDOLA, A. **Panorama atual da cadeia produtiva do leite no Brasil**. 2006. 73f. Monografia (Especialização Latu Sensu). Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

MONTEIRO, A.A.; PIRES, A.C.S.; ARAUJO, E.A., **Tecnologia de produção de derivados de leite**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. 81p.

MOURA, R. L.; GUIMARÃES, F. R.; CONSALVES, H. E. O.; CARDOSO, B. B. Qualidade microbiológica de duas marcas de leite pasteurizado tipo C, comercializados no município de Quixaramobim-CE. **Revista Higiene Alimentar**, jul./ago, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevir: Rio de Janeiro. 2006. 979p.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibiótico no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v.14, n.2, Campinas, mai/ago 2001. p. 119-124.

NOVAK, R.F. Almeida GAJ, Vieira OG, Borba ML. Colostro humano: fonte natural de probióticos? **J Pediatr**. 2001; v. 77, n- 4, p.:265-270.

ODILON, L.L. **Com crescente aumento do consumo, setor de embalagens lácteas se torna promissor**. Revista Leite e Derivados, ano XI, nº 61, novembro/dezembro, 2001.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar chesse containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, p. 446-456, 2006.

ORDÓNEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos**; tradução Fátima Murad, Porto Alegre: Artmed, 279 p., 2007.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p.167-171, 2001.

PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; MATHARA, J.M.; GUERZONI, M.E.; HOLZAPFEL H. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **International Journal Food Microbiology**. 2006, v. 107 , n-1, p: 1-11.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia. Conceitos e aplicações**. v. 2, 2 ed. Pearson Education do Brasil: São Paulo, 1997. 517p.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova** v.2, n.2, p. 293-300, 2004.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **Int J Food Microbiol.** 2006; v.108, n.2:p. 276-280. 2006.

PIRES, A.C.S. et al. Contagem de *Staphylococcus coagulase* positive em queijo mussarela fatiado. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.61, n.351, p.142-144, jun/ago, 2006.

PONTES NETTO, et al. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

PONTES, L.V. et al. Análise sensorial e perfil dos consumidores de leite em pó. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.61, n.351, p.273-275, jul/ago, 2006.

PRODAP. **Produção animal.** Leites Anormais. Disponível em : http://www.prodap.com.br/anexos/leite_anormais.PDF. Acesso em: 07 de jun. de 2012.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.65, v.3, p.194-198, 2006.

RANGEL, P. M. **Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino.** 73f. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2007.

ROOSTITA, R.; FLEET, G. H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28,n.3, p. 393-404,1996.

RUZ-PEREZ, M. et al. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, p. 663-665, 2004.

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v.49, n.10, p.471-475, 1997.

SAAD, S. M. I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte. 2006. 16f. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

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

SANTOS, M. V.; PRATA, L. F.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n.82, p. 13-19, 2001.

SBRT, Serviços Brasileiro de Respostas Técnicas. **Informações sobre Agroindústria para Beneficiamento do Leite**. Disponível em: <http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrr-referencial334.pdf>. Acesso em: 25 de Jan. de 2012.

SILVA, P. H. F. et al. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n.295, p.15-29, 1995.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, mar. 2003.

SILVA, C. R.; GUERINO, D.; DRUNKLER, A. D. Avaliação sensorial de petit-suisse elaborado com adição de soro de leite. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 581, n.333, p.134-137, jul/ago, 2003.

SILVA, P. Conceitos básicos da antibioticoterapia. In:_____. **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2006. Cap. 94. p. 933 – 943.

SILVA, W.P.; LAER, A.E.V.; LIMA, A.S.; PECHERA, S.C.; MATA, M. M.; JANTZEN, M. M. Estatus higienico-sanitário de queijos do tipo Minas produzidos de forma artesanal e comercializados em pelotas, RS. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.61, n.349, p.31-36, mar/abr 2006.

SILVA, M.H. **Estudo da variação da composição físico-química e mineral do leite na cadeia produtiva**. 2009. x Tese (Doutorado) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SOUZA, N. G.; BENEDET, H. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 156 – 162, jul/ago, 2000.

SOUZA, R.C. **Resíduos de antibiótico no leite**. 2006. (Monografia do curso de especialização “Lato Sensu” em higiene e inspeção em produtos de origem animal/vigilância sanitária de alimentos). Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: www.qualittas.com.br. Acesso em 15 de maio 2012.

SPANAMBERG, A. et al. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinae**, v.32, p.195-199, 2004.

SPINOSA, H. S. DE. Considerações gerais sobre antimicrobianos. In: _____. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1996. Cap. 34. p. 333-336.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO CUNHA, A. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n.1, p. 41-45, jan./mar., 2006.

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

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int J Food Microbiol**. 1997; v.36, n.1, p. 1-29. 1997.

SUDA, J.Y.; GONÇALVES, M.M.; TAVARES, G.M.; SILVA, N.F.N.; CARVALHO, A.F. **Caracterização de queijo tipo Quark simbiótico utilizando *Lactobacillus delbrueckii* ufv H2B20 e inulina**. UFV/XIX sic, out. 2009.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology**, fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.3, p.753-760, jul./set., 2008.

TEODORO, V.A.M.; SILVA, J.F.; PINTO, M.S. Evolução da legislação no setor de laticínios no Brasil. **Informe Agropecuário**, v.28, n.238, maio/junho, p. 14-21 2007.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**; v.17, n.107, p.52-55, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 8 ed., Porto Alegre: Artemed, 2005, 894p.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008, 203 p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y Productos Lácteos: Tecnología, Química y Microbiología**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 476, 1995.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related 3-species. **Syst Appl Microbiol**. 2005; v.28, n.5, p. 430-441.

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

VEIGA, P. G.; VIOTTO, W. .H. Fabricação do queijo petit-suisse por ultrafiltração do leite coagulado. Efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campina, v.21, n. 3, p. 267-272, set/dez, 2001.

VIEGAS,R.P., **Leites Fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácidoláticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L.acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.

VIGANÒ, A.; PELLISSIER, N.; HAMAD, H.J.; AME, S.A.; PONTELLO, M. Prevalence of *E. coli*, thermotolerant coliforms, *Salmonella* spp. and *Vibrio* spp. in ready-to-eat foods: Pemba Island, United Republic of Tanzania. **Ann Ig.**, v. 19, n. 5, p. 395-403, set./ out., 2007.

YEUNG, P.S.M.; SANDERS, M.E.; KITTS, C.L.; CANO, R.; TONG, P.S. Species-specific identification of commercial probiotic strains. **J Dairy Sci**. 2002; v. 85, n.5, p. 1039-1051

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, ASM Press: Washington DC, USA, 2003. 310 p.

ZOCHE, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná (2005). **Archives of Veterinary Science**. Curitiba, v.7, n.2, p.59-67, 2002.

CAPÍTULO 1

**QUALIDADE FISICO-QUIMICA, MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE EM PÓ DESNATADO
UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DE
PROBIÓTICO.**

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE EM PÓ DESNATADO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO.

Autor: Nelson de Carvalho Delfino

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: O leite é um alimento de grande relevância na alimentação humana, tendo em vista a diversidade de nutrientes, por ser um alimento muito perecível necessita de conservação ao qual se dá por diferentes processos. Apesar do leite em pó ser um produto geralmente seguro em relação a saúde pública, qualquer falha durante o processamento pode ocasionar alterações na qualidade microbiológica na hora do envase. A higiene, nutrição, manejo e sanidade animal, são fatores que afetam diretamente a qualidade de leite, sendo a sanidade um dos fatores de maior importância. Assim, as condições higiênico-sanitárias devem ser monitoradas para garantir um produto inócuo e de qualidade. A contaminação com micro-organismos e resíduos de antimicrobianos, constitui as causas mais frequentes de problemas sanitários, além de interferir nos processamentos tecnológicos de fabricação de derivados. O objetivo do presente trabalho foi determinar a qualidade físico-química, microbiológica e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite em pó desnatado utilizado na produção do queijo petit suisse com adição de probiótico, onde foram analisadas teores de acidez, umidade e gordura para os parâmetros físico-químicos e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais, salmonela e estafilococos, para os parâmetros microbiológicos, além da detecção de resíduos de antimicrobianos como contaminantes. Com os resultados encontrados pode se afirmar que o leite em pó desnatado está de acordo com a legislação. Não foi detectada a presença de resíduos antimicrobianos, que é um resultado satisfatório, pois não irá interferir no processo fermentativo do produto.

Palavras-chave: leite em pó desnatado, qualidade, contaminantes.

PHYSICO-CHEMICAL QUALITY, MICROBIOLOGICAL DETECTION AND WASTE OF ANTIMICROBIAL IN MILK POWDER USED IN THE PRODUCTION OF CHEESE WITH ADDED PETITSUISSE PROBIOTIC.

Author: Nelson de Carvalho Delfino

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: The milk is a food of great importance in human food, in view of the diversity of nutrients, being a highly perishable food conservation needs to which the by different processes, despite the milk powder being a generally safe product with respect to public health, any failure during processing can cause changes in microbial quality at the time of bottling. Hygiene, nutrition, management and animal health are factors that directly affect the quality of milk, the sanity of the major factors. Thus, the sanitary conditions should be monitored to ensure product quality and innocuous contamination with microorganisms and antimicrobial residues, constitutes the most frequent causes of health problems, in addition to interfering in the processing technology of manufacturing products. The objective of this study was to determine the physical chemistry, microbiological and detection of antimicrobial residues in milk powder used in the production of petit suisse cheese with added probiotics, which were analyzed levels of acidity, moisture and fat parameters for physical chemistry and counting mesophilic aerobic microorganisms, coliforms, *Staphylococcus* and *Salmonella*, for microbiological parameters, besides the detection of antimicrobial residues and contaminants. With these results can be stated that the skimmed milk powder is in accordance with the law. We did not detect the presence of antimicrobial residues, which is a satisfactory result, it will not interfere with the fermentation process of the product.

Keywords: skimmed milk powder, quality, contaminants.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de grande relevância na alimentação humana, tendo em vista a diversidade de nutrientes (BARBOSA et al., 2007) Do ponto de vista biológico, o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos por apresentar, entre outras características, elevado teor de proteínas e sais minerais, alto conteúdo de água e pH próximo ao neutro (ZUCCHE et al., 2002).

Como fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas, o leite torna-se também um excelente meio para o crescimento de diversos micro-organismos desejáveis e indesejáveis, que podem causar sua deterioração (ALVES, 2006; LORENZETTI, 2006). Esses micro-organismos podem ser provenientes do próprio animal, do ser humano e dos utensílios utilizados na sala de ordenha (ARCURI et al., 2006).

O leite por ser um alimento muito perecível necessita de conservação ao qual se dá por diferentes processos. Entre os empregados destacam-se a refrigeração e a técnica de secagem (JUNIOR et al., 2005). Considera-se leite em pó o produto lácteo obtido por meio do processo de desidratação de leite de vaca integral, desnatado ou semidesnatado, sendo que o teor de gordura é regulado conforme a legislação para cada tipo (BRASIL, 1996; RODAS et al., 1999).

Segundo Mettler (1994), apesar do leite em pó ser um produto geralmente seguro em relação a saúde pública, qualquer falha durante o processamento pode ocasionar alterações na qualidade microbiológica na hora do envase.

A higiene, nutrição, manejo e sanidade animal, são fatores que afetam diretamente a qualidade de leite, sendo a sanidade um dos fatores de maior importância (KOIDE e GIROTO, 2004).

Procedimentos de higienização empregados nos processos de obtenção do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade. Assim, as condições higiênico-sanitárias devem ser monitoradas para garantir um produto inócuo e de qualidade, sendo uma ferramenta para determinação dos pontos da cadeia produtiva que podem ser melhorados (MORAES et al., 2005; PINTO, MARTINS e VANETTI, 2006).

A contaminação com micro-organismos e resíduos de antimicrobianos, constitui as causas mais frequentes de problemas sanitários, além de interferir

nos processamentos tecnológicos de fabricação de derivados, ocasionando perdas econômicas (PADILHA et al., 2001; TENÓRIO et al., 2009).

A presença de resíduos de antibióticos no leite decorre principalmente devido ao abuso de medicamentos e da utilização de maneira inapropriada, como por exemplo, uso de drogas não recomendadas e com farmacocinética não perfeitamente conhecida; uso de doses excessivas e a não obediência ao período de descarte do leite de animais em tratamento (COSTA et al., 2000).

Mantendo um rígido controle de qualidade o produtor e as indústrias poderão assegurar a qualidade do produto final, aumentando os níveis de aceitabilidade do produto no mercado e garantindo a satisfação do consumidor (PRAÇA et al., 2006).

As análises microbiológicas do leite fornecem informações úteis que refletem as condições sob as quais o mesmo foi obtido, processado e armazenado (PIETROWSKI et al., 2008).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a qualidade físico-química, microbiológica e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite em pó desnatado utilizado na produção do queijo petit suisse com adição de probiótico.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Aquisição da matéria prima

No mês de setembro de 2012 foram adquiridas 9 amostras de leite em pó desnatado com 200 g/cada, sendo três amostras de cada lote (três lotes distintos) (Tabela 1), no comércio varejista da cidade de Salvador/BA, observando-se data de fabricação, prazo de validade, lote e a integridade das embalagens, sendo transportadas para o Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados, da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, onde foram realizadas as análises físico-químicas, microbiológicas e a detecção de resíduos de antimicrobianos.

Tabela 1. Amostras de leite em pó obtidas no comércio varejista de Salvador-Bahia.

Data	Lote 1 (três amostras)	Lote 2 (três amostras)	Lote 3 (três amostras)
Fabricação	23.07.12	22.08.12	10.09.12
Validade	24.07.13	22.08.13	10.09.13

2.2 Análises Físico-químicas

2.2.1. Acidez titulável

O fundamento consiste na titulação de determinada massa da amostra reconstituída, por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína. O procedimento consistiu em pesar 5 g de leite em pó desnatado, diluído em 50 mL de água. Adicionou-se 10 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titulou-se com solução alcalina de hidróxido de sódio 0,1N, até aparecimento de coloração rósea, tênue e persistente (BRASIL, 2006). O resultado foi expresso pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de ácido láctico no leite em pó desnatado} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = massa da amostra, em gramas.

As mostras foram realizadas em triplicata os resultados expressos pela média.

2.2.2. Umidade

A umidade é determinada pela perda de massa em condições nas quais água e substâncias voláteis são removidas. O resíduo obtido após evaporação representa os sólidos totais da amostra. O procedimento consistiu em aquecer a cápsula e tampa em estufa a 102 +/- 2°C, por 1 hora e esfriou-se no dessecador, até temperatura ambiente (no mínimo 30 minutos) e pesou-se. Acrescentou-se 5

gramas de amostra e adicionou-se algumas pérolas de vidro, aqueceu-se a cápsula, em estufa 85 +/- 2°C por 2 horas. Esfriou-se em dessecador à temperatura ambiente (no mínimo 30 minutos) e pesou-se, repetiu-se a operação de aquecimento por 30 minutos. Esfriou-se e pesou-se. O resultado foi obtido pela fórmula: % umidade = $100 \times m / m'$, onde m é a perda da massa em gramas, e m' a massa da amostra em gramas. As mostras foram realizadas em triplicata os resultados expressos pela média (BRASIL, 2006).

2.2.3. Gordura

A determinação foi feita pelo método butirométrico, que baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura foi feita na escala do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria. No procedimento pesou-se 1,5 g de leite em pó desnatado em um béquer de 50 mL, adicionou-se 10 mL de água a 65°C, misturou-se até completa dispersão e deixou-se esfriar. Transferiu-se 1 g desta mistura para um béquer de 50 mL, adicionou-se 10 mL da solução de ácido sulfúrico com densidade de 1.500 g/L, a 20°C, posteriormente aqueceu-se a 60°C e homogeneizou-se com bastão de vidro e transferiu-se cuidadosamente para o butirômetro, lavando-se o béquer duas vezes com 4 mL da solução de ácido sulfúrico, completando 19 mL. Adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico, tampou-se com a rolha adequada e agitou-se vigorosamente invertendo várias vezes o butirômetro. Posteriormente levou-se ao banho-maria a 65°C por 15 minutos e centrifugou-se por mais 15 minutos a 1200 rpm. Procedendo-se a leitura na escala do butirômetro. As mostras foram realizadas em triplicata os resultados expressos pela média (BRASIL, 2006).

2.3. Análises Microbiológicas

2.3.1. Contagem de mesófilos aeróbios

A partir de 25 g da amostra de leite em pó desnatado, de cada lote, foram preparadas diluições em 225 mL água peptonada a 0,1%. Em seguida, 1mL das diluições foram transferidas para placas de Petri e então verteu-se 15 mL de Ágar Contagem Padrão (PCA), previamente fundido a uma temperatura de 45 °C. Após a homogeneização, as placas foram incubadas em estufa a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. As análises foram realizadas em triplicata e a contagem das colônias foi feita com o auxílio de um contador de colônias. A média do número de colônias contadas nas placas foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente e o resultado foi expresso em unidades formadores de colônia por mL de amostra (UFC/ mL) (BRASIL, 2003).

2.3.2. Número mais provável de coliformes totais (NMP)

Baseia-se na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio e caldo verde brilhante bile lactose 2%, em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

A partir de 25 g da amostra de leite em pó desnatado, (retiradas em condições de assepsia), de cada lote, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}) utilizando-se o Bag Mixer 400 (Interscience). Em seguida 1 mL da diluição (10^{-1}) foi inoculada em uma série de três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%,. A partir da diluição 10^{-1} , preparou-se a diluição 10^{-2} inoculando-se 1 mL desta em 9 mL de água peptonada a 0,1% em seguida inoculou-se em uma série de três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%,. A diluição 10^{-3} foi preparada a partir da inoculação de 1 mL da diluição 10^{-2} em 9 mL de água peptonada, e em seguida 1 mL desta solução foi inoculada em três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%,. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultados positivos, verificou-se o

Número Mais Provável (NMP) utilizando a tabela de NMP. Os resultados foram expressos em NMP/g ou mL.

2.3.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. seguiu a metodologia recomendada Andrews (2012), consistiu das seguintes etapas: (a) pré-enriquecimento da amostra em caldo lactosado, 35 °C por 24 horas; (b) enriquecimento seletivo em caldo tetrionato de sódio e caldo *Rappaport* (42 ± 0,2 °C/24 horas); (c) plaqueamento seletivo diferencial em *Agar* xilose lisina desoxicolato e *Agar* entérico de *Hektoen* com incubação a 35 °C por 24 horas; (d) identificação bioquímica em meio de *Agar* tríplice açúcar ferro (*Agar* TSI) e *Agar* ferro lisina descarboxilase a 35 °C por 24 horas; e (e) confirmação sorológica pela detecção de antígenos somáticos (poli O) flagela res (poli H).

2.3.4. *Staphylococcus* coagulase positiva

A determinação de *Staphylococcus* foi realizada pelo método da contagem direta em placas. Usando-se as mesmas diluições utilizadas na análise de coliformes, foi inoculado 1 mL de cada diluição em 3 placas contendo *Agar* Baird Parker. Após a incubação a 35 °C por 24 a 48 horas, foram observadas a presença de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus*, sendo realizada a sua contagem em placas contendo de 20 a 200 colônias. Estas colônias foram confirmadas (5 colônias típicas e 5 atípicas) realizando o teste de catalase. Depois se aplicou uma formula descrita no método da Instrução Normativa nº62 de 2002 e chega-se ao Número de Unidades Formadora de colônia (UFC) de *Staphylococcus* coagulase positiva por grama da amostra.

2.4. Detecção de Resíduos de Antimicrobianos

Na análise foi empregado o kit para detecção de resíduos de antibióticos Delvotest® (Gist Brocades Food Ingredients, Inc., King of Prussia, Pa, USA). O kit é comercializado na forma de ampolas contendo cada uma delas um ágar com um número padronizado de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, nutrientes

para o desenvolvimento do micro-organismo e um indicador, o púrpura de bromocresol. O Delvotest® é um teste baseado na inibição do crescimento e da produção de ácido pelo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Na presença de resíduo de drogas, a cor púrpura original do indicador de pH não se altera. Foi considerado negativo quando a solução adquiriu coloração amarela, indicando que houve desenvolvimento do micro-organismo.

Foram adicionados 0,1 mL das amostras de leite nas ampolas contendo *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*. As ampolas foram incubadas em banho-maria a 64 °C mais ou menos 0,5 ° C por três horas. As análises foram realizadas em triplicata os resultados expressos pela média (HAVERBECK, MULLAN e WALKER, 1983).

3. ANÁLISES DOS RESULTADOS

Foi realizada análise descritiva dos resultados. A comparação entre as médias dos lotes foi realizada a análise de variância (A NOVA) dos resultados e as médias dos dados microbiológicos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e a correlação entre mesófilo, acidez e umidade, pelo coeficiente de correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises Físico-químicas

Analisando os resultados obtidos na Tabela 2 e Gráfico 1 verifica-se que todas as amostras estão dentro dos padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 1996), porém o lote 3 apresentou uma acidez menor em relação aos demais, este fato pode estar relacionado ao período de fabricação mais recente da amostra ou ser oriundo de um leite de melhor qualidade.

Tabela 2 – Resultados médios das análises de acidez, umidade e gordura do leite em pó desnatado

Amostra	Acidez (D)	Umidade (%)	Gordura (%)
Lote 1	17,3667 +/- .11547	2,4133 +/- .04509	0,0
Lote 2	17,4333 +/- .11547	2,1733 +/- .05508	0,0
Lote 3	16,6667 +/- .05774	2,4500 +/- .26086	0,0

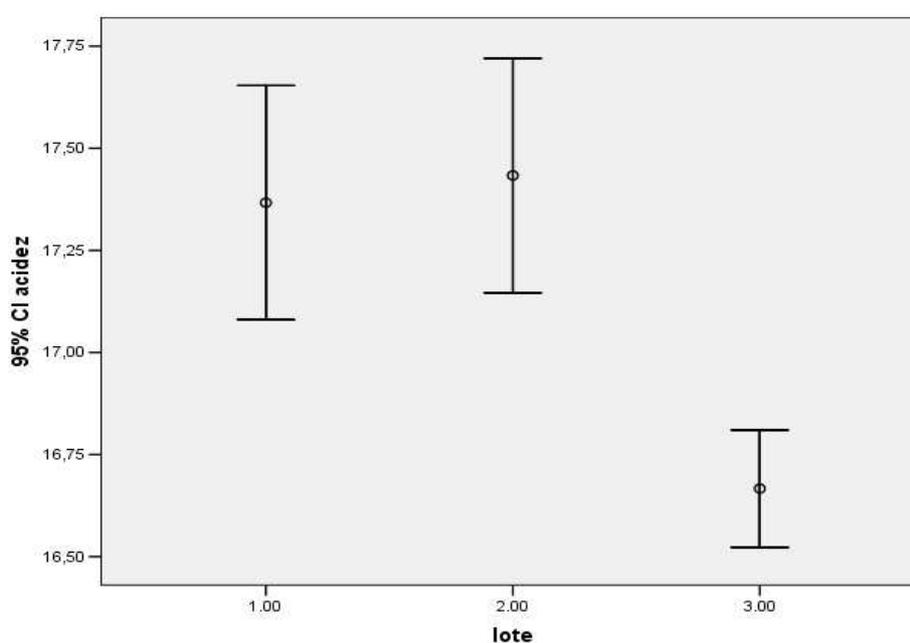


Gráfico 1. Valores médios da determinação de acidez titulável no leite em pó desnatado.

Resultados semelhantes a esta pesquisa foram verificados por Foppa et al. (2009), quando avaliaram a acidez do leite em pó comparada ao leite UHT integral. Os autores afirmam ainda que o teste de acidez é normalmente utilizado em controle de qualidade do leite e derivados, como também no controle de processamento para a fabricação de derivados lácteos, além de demonstrar o estado de conservação do leite, e a medida que o leite vai envelhecendo, ela tende a aumentar.

Aumentos nos níveis de acidez com o tempo de estocagem foram verificados por Soler et al.(1991) e Campos et al. (1998), os quais podem estar

relacionados com reações químicas de oxidação no produto e a taxa de permeabilidade de oxigênio pela embalagem.

Lapusane Giurgiulescu (2009), avaliando a composição química do leite em pó com 26% de matéria gorda e o leite rico em nutrientes com 12,7% de gordura, verificaram que o leite com maior teor de gordura apresentou uma acidez de 17°D, enquanto leite rico em nutrientes com baixo teor de gordura foi de 16°D.

Oliveira et al. (2000), avaliando o efeito das características microbiológicas do leite cru na qualidade do leite em pó integral, no período de junho a outubro de 1997 no Estado de Minas Gerais, Brasil, desde a estocagem do leite cru de 4 a 7°C até a secagem por atomização e simultaneamente injeção direta de ar a 270°C, encontraram média de acidez titulável de 0,17% em 16 lotes pesquisados.

Krey e Souza (2009), avaliando a qualidade físico-química do leite em pó integral produzido em uma indústria da região do Taquari/RS, verificaram que houve um aumento significativo de acidez em relação ao envase do produto e o leite estocado com três meses de armazenamento em 95% dos lotes avaliados, sendo que de terceiro para o sexto mês, o aumento de todos os lotes analisados não foi significativo. No terceiro mês, apenas uma amostra estava acima dos valores permitidos pela legislação, já no sexto mês, duas amostras estavam em desacordo ao padrão.

Khier e Yagoub (2009), pesquisando amostras de leite produzidas no Sudão e em outras localidades, encontraram menores valores de acidez titulável (1,34%) nas amostras oriundas do Sudão, enquanto as provenientes de outros locais apresentaram acidez de 1,40 a 1,49%.

Griffithset et al. (1998), em seus estudos encontraram pouca variação no teor de acidez titulável do leite em pó desnatado, quando o leite *in natura*, na etapa de pasteurização foi tratado a 74°C por 16 segundos.

Guerra, Neves e Pena (2005), avaliando a acidez titulável do leite bubalino obtido mediante secagem por nebulização, encontraram 0,8% de média em duas determinações, no município de Benevides – Pará.

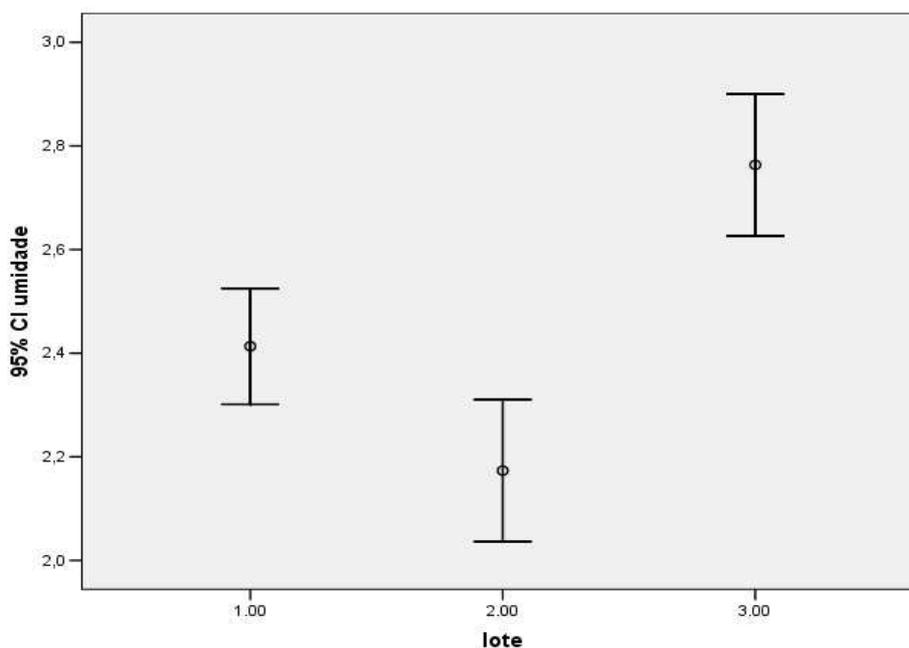


Gráfico 2 - Valores médios de determinação de umidade no leite em pó desnatado

Conforme pode ser observado na Tabela 2 e gráfico 2 os valores médios de umidade do leite em pó desnatado estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1996), porém o lote 3 apresentou maior percentual de umidade embora uma menor acidez titulável, tendo em vista apresentar vida de prateleira mais recente. Valores de umidade superiores a esta pesquisa foram observados por Krey e Souza (2009), em seus estudos pesquisando vida de prateleira de leite em pó na região do Vale do Taquari/RS.

Também encontraram valores superiores Ramos e Baggio (2013), estudando as características físico-químicas do leite em pó desnatado no município de Campinas-São Paulo, os quais encontraram valores de umidade em torno de 3,7 a 4,8% em seis determinações.

Rodrigues et al.(2006), avaliando a umidade do leite em pó integral, como matéria-prima para fabricação de sorvete sabor chocolate com reduzido teor de gordura, encontraram valores médio de umidade de 3,89%.

Perrone et al. (2011), pesquisando a umidade de leite em pó obtido por secagem em mini-spray-dried verificaram teor de umidade em seis amostras de 2,84% em média.

Birchalet et al. (2002), em sua pesquisa de análise preliminar da secagem de leite de suspensão em secadores do tipo spray, encontraram teor de umidade de 3,0 a 2,5%.

Resultados inferiores a esse estudo foram verificados por Campos, Treptow e Soares (1998), em amostras de leite em pó integral produzidas em uma Cooperativa no município de Capão do Leão-Rio Grande do Sul, os quais encontraram valores médio de 2,12%.

Knegt e Van DenBrink (1998) relatam que a umidade é um fator relevante para determinar a qualidade do produto. Várias são as formas em que a água esta presente no leite em pó: água fortemente ligada (água de hidratação) representada pela água de cristalização como na alfa-lactose e em alguns sais presentes no interior de algumas proteínas globulares; água com laços fracos devido a ligações de hidrogênio e interações dipolo de grupos ionizados; água muito fracamente ligada, água ligada a um grupo ou superfície hidrofóbica (WALSTRA e JENNESS, 1984).

Os resultados obtidos para as determinações do teor de gordura estão condizentes com a legislação vigente, que preconiza para leite em pó desnatado valor máximo de 1,5% (BRASIL,1996).

Valores semelhantes foram verificados por Venturoso et al. (2007), avaliando leite em pó desnatado, mediante a técnica de Gerber e ultra-som, os quais encontraram 0% de gordura por ambos os métodos;

Ramos e Baggio (2009), avaliando o teor de gordura do leite em pó desnatado, encontraram valores médios de 1,1 a 1,6% no comércio de Campinas-SP.

4.2. Análises Microbiológicas

Na tabela 3 observa-se que os resultados obtidos estão em conformidade com a legislação (BRASIL,1996). Ainda na mesma tabela verifica-se que nas amostras pesquisadas não houve crescimento para coliformes totais, *Salmonella* ssp. e *Staphylococcus* coagulase positiva. Além disso, demonstram boa qualidade das condições higiênico-sanitárias durante o processamento do produto, mostrando a importância da manutenção dos Programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nessa indústria de leite em pó.

Tabela 3 - Resultado das análises microbiológicas do leite em pó desnatado

N° amostra	Lote	Mesófilos log.UFC.g ⁻¹	Coliformes Totais – NMP/g.	Salmonella SSP	Staphylococcus coagulase Positiva
3	1	1.2167+/-0.06110	< 0,3	Ausente	< 10
3	2	1.1700+/-0.8544	< 0,3	Ausente	< 10
3	3	1.4400+/-01732	< 0,3	Ausente	< 10

Resultados superiores a esse trabalho foram evidenciados por Krey e Souza (2009), que encontraram uma população de mesófilos de $9,0 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^3$ UFC/g e ausência de coliformes totais em leite em pó integral após o envase.

Campos, Treptow e Soares (1998) também encontraram resultados superiores a esta pesquisa de $6,5 \times 10^2$ UFC/g para mesófilos e ausência de coliformes totais, em leite integral estocado por 12 meses a temperatura de 18,21°C e umidade relativa de 79,6%.

Mallmann et al. (2008), avaliando a qualidade do leite em pó comercializado em Fortaleza-Ceará, encontraram enterobactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* e *Escherichia* spp., sendo as seguintes espécies isoladas: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcenenses*, *Escherichia* spp, *E. gergoviae* e *Hafnia alvei*.

Fonseca (2010), analisando o efeito do tempo de armazenamento do leite de cabra *in natura* sobre a qualidade e estabilidade do leite de cabra em pó, encontrou uma população de mesófilos que variou de 2,52 a 2,83 log.UFC/g, enquanto *Salmonella* spp, coliformes totais *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva não foram detectados, porém em uma das três repetições houve contaminação por coliformes e *Bacillus cereus*.

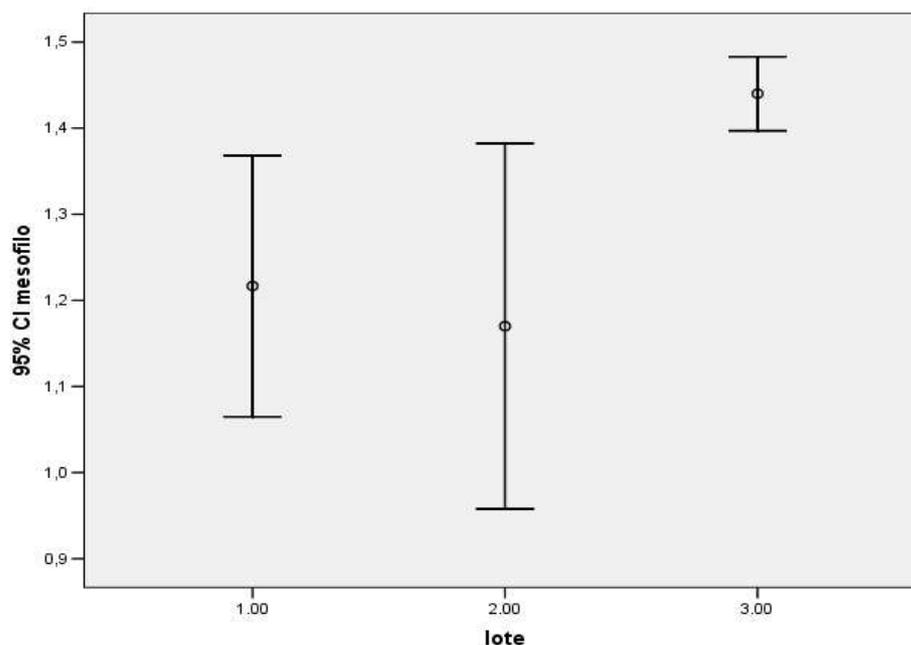


Gráfico 3 - Valores médios de determinação do número mesófilos no leite em pó desnatado.

Tabela 4 - Matriz de correlações entre os resultados das análises de mesófilos, acidez titulável e umidade do leite em pó desnatado.

		Mesófilos	Acidez	Umidade
	Correlação Pearson	1	-.840 (**)	.928 (**)
Mesófilos	Significância		.005	.000
	Número de amostras	9	9	9
	Correlação Pearson	-.840 (**)	1	-.872 (**)
Acidez titulável	Significância	.005		.002
	Número de amostras	9	9	9
	Correlação Pearson	.928 (**)	-.872 (**)	1
Umidade	Significância	.000	.002	
	Número de amostras	9	9	9

**** Correlação é significativa em nível de 0.01.**

A Tabela 4 apresenta a matriz de correlação entre os resultados das análises de mesófilos, acidez titulável e umidade do leite em pó desnatado. Observa-se que mesófilos com acidez titulável $P = -0,84$, mesófilos com umidade, $P = 0,92$, acidez titulável com umidade $P = -0,87$.

4.3 Resíduos de Antimicrobianos

Com relação aos resíduos de antimicrobianos não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas neste trabalho.

Resultados semelhantes foram encontrados por Becker et al. (2010), avaliando a qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó, comercializado na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguçu-Paraná, em 20 amostras de leite.

Cunha (2009), pesquisando multirresíduos de antibióticos anfenicois e beta-lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de massa, em 475 amostras de leites integrais e UHT e 140 amostras de leite em pó, oriundas de vários estados do Brasil, verificou positividade em apenas três amostras de leite em pó.

Os resultados positivos preocupam, pois a presença de antibióticos pode causar diversos problemas, tanto do ponto de vista de saúde pública como tecnológico. Os resultados negativos demonstram que as amostras analisadas atendem ao Programa de qualidade do leite quanto ao PNCR (BRASIL, 1999).

5. CONCLUSÃO

Com base nas análises físico-químicas e microbiológicas realizadas no presente trabalho pode se afirmar que o leite em pó desnatado utilizado na fabricação de queijo petit suisse probiótico, esta de acordo com a legislação.

Não foi detectada nas amostras de leite em pó desnatado a presença de resíduos antimicrobianos, que é um resultado satisfatório, pois não irá interferir no processo fermentativo do produto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; BRITO M. F. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA G. N. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p. 440-446, 2006.

ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BARBOSA, A.S., et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e pasteurizado consumido no município de queimadas, PB. Disponível em http://www.annq.org/congresso2007/trabalhos_apresentados/T127. Acesso em 10 de jan 2013.

BECKER, T. A. et al. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.707-716 , jul/set. 2010.

BIRCHAL, V. S., et al. Análise preliminar da secagem de suspensão de leite em secadores do tipo spray. **Revista Universidade Rural, Ciência exatas e da terra**. v.21, n.1, p. 01-10, suplemento, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 146 de 07 de mar de 1996 Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PNCRC; **Instrução Normativa**, DAS n.42 de 20 de dezembro de 1999. Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n.62 de 26 agosto de 2003. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa**, n.68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília, 2006.

CAMPOS, L.R.; TREPTOW, R.O.; SOARES, G.J.D. Influência da inertização com nitrogênio na vida-de prateleira de leite em pó integral acondicionado em embalagens metalizadas flexíveis. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 2, n. 2, p. 130-137, 1998.

COSTA, E.; RAIÁ, R.; WATANABE, E. T.; GARINO, F. JR.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios não tratados. **Napgama**, v. 3, n. 4, 2000.

CUNHA, M. R. R. Análise de multirresíduos antibióticos anfenicóis e betalactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada ao detector de massas. Universidade estadual de Campinas - UNICAMP. Faculdade de Engenharia de Alimentos tese de doutorado, 2009.

FONSECA, C. R. Efeito do tempo de armazenamento do leite de cabra *in natura* sobre a qualidade e a estabilidade do leite de cabra em pó. Tese de Doutorado. Faculdade de Zootécnia e engenharia de alimentos – Universidade de São Paulo-USP. Pirassununga, 2010. 91 f.

FOPPA, T. et al. Análises físico-químicas do leite em pó comparado ao leite UHT integral. Ágora: **Revista de Divulgação Científica**. Mafra, v.16, n.1, 2009.

GRIFFITHS, M. W. The quality of skim-milk powder produced from aw Milk stored at 2 degree. **Food Microbiology**. n.5, p 89-96, 1988.

GUERRA, R. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R.S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. Revista Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Campinas. v.25, n.3, p. 443-447, jul/set. 2005.

HAYERBECK, J.; MULLAN, W. M. A.; WALKER, A. L. Sensitivity of the intertest, Oxoid test, Delvotest P and disc assay to antibiotics. **International Journal of Dairy Technology**. v.36, n.2, p. 36-40, april, 1983.

JUNIOR, W.M.A. et al. Secagem de leite em leite de jorro. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005. UNICAMP. Campinas, p.1-6, 2005.

KHIER, M. K. S. E.; YAGOUB, A. E. G. A.Quality Assessment of Milk Powders Packed in Sudan.**Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 388-391, 2009.

KNEGT, R. J.; van den BRINK, H. Improvement of the drying oven method for the determination of the moisture content of milk powder. **International Dairy Journal**. v.8, n.8 p. 733-738, august 1998.

KOIDE, E. M.; GIROTO, J. M. Verificação da presença de resíduos antimicrobianos em leite *in natura* na região dos Campos Gerais - Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 33, p. 436-438, jul. 2004.

KREY, T.; SOUZA, C. F. V. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do Vale do Taquari/RS. **Interbio**, v.3, n.2, p. 65-72, 2009.

LAPUSAN, A. V.;GIURGIULESCU, L.Research regarding the chemical composition of powder milk with nutrients.**Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n.1, p.1-6, 2009.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrófilos no leite cru de dois**

estados da região Sul. 2006.71f. Dissertação. (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MALLMANN, E. J. J., et al. Enterobacterias isoladas de amostras de leite em pó comercializados na cidade de Fortaleza-Ceará. **Anais...** 48º Congresso Brasileiro de Quimica. Rio de Janeiro, 2008

METTLER, A.E. Present Day requirements for effective pathogen control in spray dried milk powder production. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 4, n. 3, p. 95-10, 1994.

MORAES, C. R.; FUETEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p. 259-264, 2005.

OLIVEIRA, C. A. F. Effect of microbiological characteristics of raw Milk on the quality of whole milk powder. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.31, n. 2. apr/june 2000.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n.2, p. 167-171, mar./abr., 2001.

PERRONE, I. T., et al. Leite em pó desnatado, soro em pó e misturas de leite e soro em pó obtidos em minispray dryer: análise de isoterma e aplicação do modelo de BET. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 381, p. 34 – 40, jul/ago, 2011.

PIETROWSKI, G. A. M.; OTT, A. P.; SIQUEIRA, C. R.; SILVEIRA, F. J.; BAYER, K. H.; CARVALHO, T. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Ponta Grossa-PR. **VI Semana de Tecnologia em Alimentos**. v.2, n.36, 2008.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETT, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrótróficos proteolíticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26, n.03, jul./set., 2006.

PRAÇA, I. M.; FERREIRA, M. S.; AMORIM, D. C. S. DE.; SILVA, R. R. da. Avaliação de impactos causados pela presença de resíduos de antimicrobianos no leite para a produção de queijos mussarela. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p. 330 – 332, jul/ago, 2006.

RAMOS, M. M.; BAGGIO, S. R. Avaliação das características físico-químicas de leite em pó. Disponível: www.iac.sp.gov.br, acesso em 03 de Janeiro de 2013.

RODAS, M.A.B. et al. Avaliação da qualidade do leite em pó pelo exame de suas características sensoriais. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p. 48-50, 1999.

RODRIGUES, A. P. et al. Elaboração de sorvete sabor chocolate com teor de gordura reduzido utilizando soro de leite em pó. **Vetor Rio Grande**. V.16, n.1/2, p.55-62, 2006.

SOLER, R.M. *et al.* Desempenho de latas de folha não revestida no acondicionamento de leite em pó integral. **Coletânea ITAL**, v. 21, n.1, p. 145-154, 1991.

TENÓRIO, C.; CERQUEIRA, M.M. VIEGAS, R. P.; RESENDE, M.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K.; SOUZA, M.R.; PENNA, C. F. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.2, p.504-510, 2009.

VENTUROSOS, R. C. et al. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V.43, n.4, p. 607-613 out/dez, 2007.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 467 p.

ZUCCHE et al. Qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.59-67, 2002.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*

PRODUÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO

Lactobacillus casei

Autor: Nelson de Carvalho Delfino

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: A crescente preocupação em aumentar a expectativa de vida da população gerou e ainda promove vários estudos no campo da nutrição, especialmente aqueles com alimentos e seus efeitos no organismo humano realizados com a obsessão em melhorar a qualidade nutricional e de vida havendo considerável interesse em incentivar o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado para estes ingredientes. O mercado mundial de alimentos funcionais está em pleno crescimento e procurando sempre novos produtos com características funcionais tecnológicas e fisiológicas. O queijo petit suisse é um produto de alto valor nutricional destacando-se a alta percentagem 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. O objetivo deste trabalho foi produzir um queijo petit suisse com adição do probiótico *Lactobacillus casei* BGP 93 e determinar a qualidade físico-química, microbiológica e a viabilidade do lactobacilo no queijo durante o período de estocagem, onde foram analisados os teores de proteínas, gordura no extrato seco, umidade e pH, para os parâmetros físico-químicos e detecção de coliformes totais, estafilococos, salmonela, *Listeria monocytogenes* e fungos filamentosos e leveduras para os parâmetros microbiológicos, além do acompanhamento da viabilidade do *Lactobacillus casei* BGP 93 durante sua vida útil. O queijo petit suisse mostrou ser um bom veículo para adição de microrganismo probiótico, O *Lactobacillus casei* se manteve viável durante a vida de prateleira, mesmo com a diminuição do pH, podendo o queijo ser considerado um produto funcional durante 30 dias de armazenamento.

Palavras-chave: queijo, probiótico, lactobacilos

**PRODUCTION OF PETIT SUISSE CHEESE WITH ADDITION OF PROBIOTIC
*Lactobacillus casei***

Author: Nelson de Carvalho Delfino

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: The growing concern of increasing life expectancy has generated and still promotes several studies in the field of nutrition, especially those with food and their effects on the human body conducted with the obsession to improve the nutritional quality of life and there is considerable interest in encouraging development of new ingredients, enabling innovation in food products and creating new market niches for these ingredients. The global market for functional foods is growing and always looking for new products with functional technological and physiological characteristics. The petit suisse cheese is a product of high nutritional value emphasizing the high percentage of milk protein well as its marked degree of digestion and assimilation by the human body, besides being rich in calcium, phosphorus and fat-soluble vitamins. The objective of this study was to produce a petit suisse cheese with addition of probiotic *Lactobacillus casei* BGP93 and determine the physical chemistry, microbiological and viability of lactobacilli in cheese during the storage period, where we analyzed the levels of protein, fat on dry, moisture and pH, for physical chemistry parameters and detection of coliforms, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds for microbiological parameters, and monitoring the viability of *Lactobacillus casei* BGP93 during its life time. The petit Suisse proved to be a good vehicle for adding probiotic microorganism, the *Lactobacillus casei* remained viable during shelf life even with decreasing pH, the cheese can be considered a functional product during 30days of storage.

Keywords: cheese, probiotic, *Lactobacillus casei*

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação em aumentar a expectativa de vida da população gerou e ainda promove vários estudos no campo da nutrição, especialmente aqueles com alimentos e seus efeitos no organismo humano realizados com a obsessão em melhorar a qualidade nutricional e de vida. A alimentação é fator primordial tanto na prevenção quanto na promoção para a saúde humana, evitando e controlando várias doenças, com destaque das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), como diabetes, hipertensão, neoplasias e insuficiência cardíaca. Sendo assim, inúmeros estudos foram realizados com o intuito de comprovar a atuação de alguns alimentos na redução de riscos destas doenças, e das diarreias causadas por uma microbiota desbalanceada, doenças inflamatórias intestinais, eczema atópico, etc. Além disso, há considerável interesse em incentivar o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado para estes ingredientes (RAIZEL, et al.2011).

O mercado mundial de alimentos funcionais está em pleno crescimento e procurando sempre novos produtos com características funcionais tecnológicas e fisiológicas. A indústria de laticínios está entre as que mais se destacam na disponibilização de produtos funcionais, em especial nos segmentos de iogurtes e outros leites fermentados em que essa funcionalidade é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas e/ou adição de ingredientes prebióticos (SOUZA, et al., 2011).

O queijo petit suisse é um produto de alto valor nutricional destacando-se a alta percentagem de proteínas lácteas, mínima de 6% (BRASIL, 2000) bem como seu grau acentuado de digestão e assimilação pelo organismo humano, além de ser rico em cálcio, fósforo e vitaminas lipossolúveis (GAMBELLI et al., 1999; VAN DENDER et al., 1985).

Entre os parâmetros que influenciam na variedade e qualidade dos queijos petit suisse encontram-se as etapas de pasteurização, coagulação, fermentação (KELLY; O'DONNELL, 1998) O leite previamente aquecido antes da acidificação a uma temperatura e tempo superior ao da pasteurização, resulta em um maior rendimento do queijo causado pela incorporação de água pelas proteínas desnaturadas, e assim, maior retenção da mesma. Isto ocorre devido a maior

interação das proteínas do soro com a caseína (GAMBELLI et al., 1999; KELLY e O'DONNELL, 1998).

O objetivo deste trabalho foi produzir um queijo petit suisse com adição do probiótico *Lactobacillus casei* BGP 93 e determinar a qualidade físico-química, microbiológica e a viabilidade do lactobacilo no queijo durante o período de estocagem.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Produção do Queijo Petit Suisse

2.1.1. Ingredientes e aditivos

- a. Leite em pó desnatado
- b. Coagulante comercial – HÁ-LA (Christian Hansen®, Valinhos, Brasil)
- c. Cultura probiótica – *Lactobacillus casei* BGP-93 (Grupo Clerict-Sacco®)
- d. Sacarose – açúcar refinado
- e. Cloreto de cálcio
- f. Creme de leite pasteurizado e UHT
- g. Polpa de morango integral (Borsato®)

2.1.2. Processo de fabricação do queijo petit suisse com adição do probiótico

Foram produzidos três lotes de Queijo Petit Suisse seguindo metodologia descrita por Albuquerque (2002) (Figura 1). O queijo foi produzido no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados da Escola de Medicina Veterinária e Zootécnia da Universidade Federal da Bahia. O leite foi reconstituído, pasteurizado a 65°C por 30 minutos e resfriado para 35°C, onde foi acrescido de cloreto de cálcio na proporção de 25 mL para cada 100 L de leite em pó reconstituído; coalho, na proporção de 10% da recomendada pelo fabricante e fermento láctico probiótico *Lactobacillus casei* BGP93 da marca Sacco® . A mistura foi colocada em balde plástico sanitizado e foi fechada e incubada durante 12 horas (Figura 2). Após a fermentação foi realizado o dessoramento para obtenção da massa. Foram efetuadas 2 lavagens com 1 litro de água fervida e

resfriada em cada lavagem, até atingir pH próximo de 4,5, sendo acrescentado creme de leite para correção da gordura na proporção de 9%, açúcar 16% e a polpa de fruta sabor morango (Borsato®) na proporção de 5 % (Figura 3).

Os queijos foram envasados em potes de polietileno com tampa, sendo armazenado a temperatura não superior a 10°C.

Fluxograma de produção do queijo petit suisse com adição de probiótico.

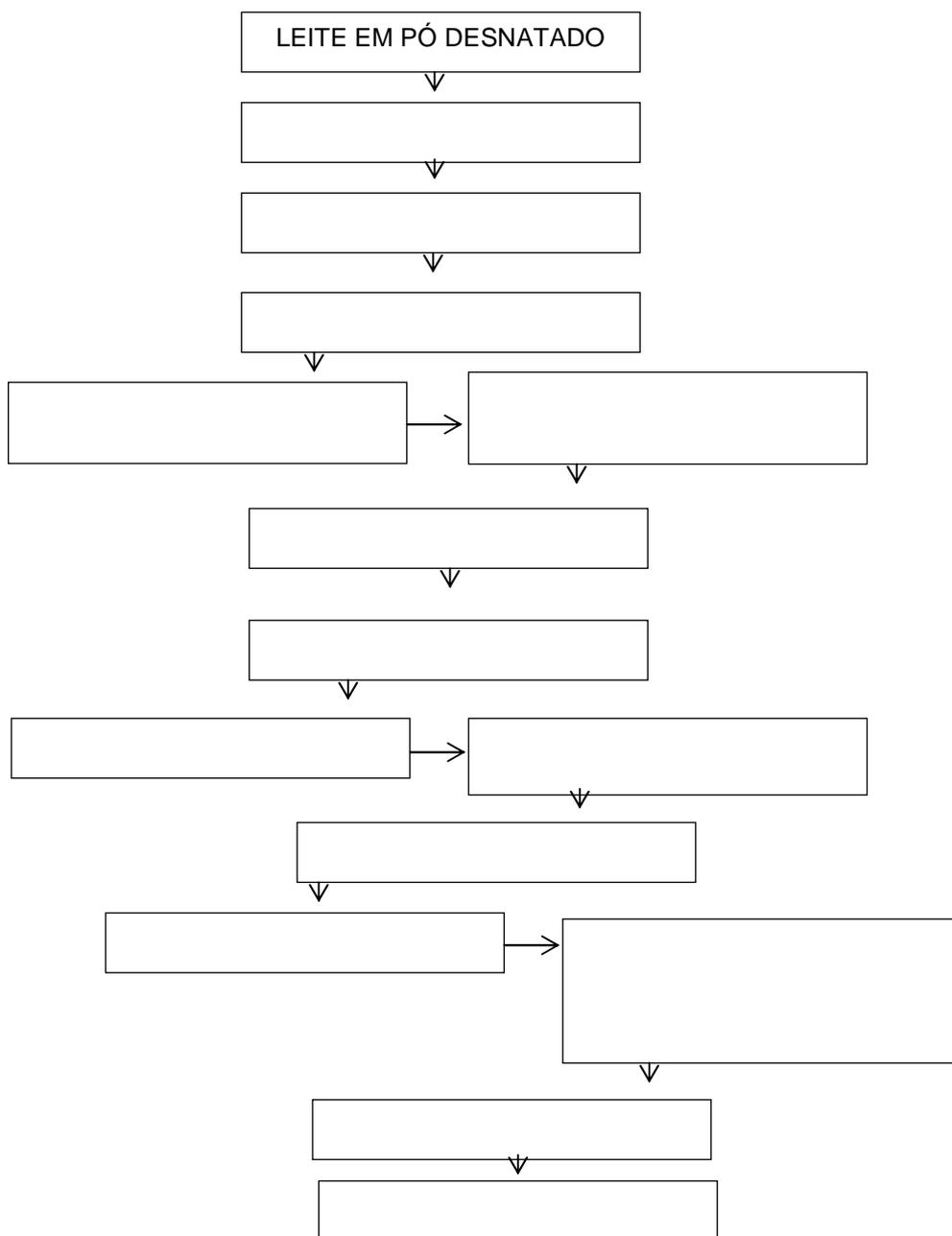


Figura 1: Fluxograma de fabricação do queijo petit suisse com adição de probiótico (Albuquerque, 2002).

Figura 2: Coagulação do leite para elaboração de queijo petit suisse com adição de probiótico



Figura 3: Queijo petit suisse com adição de probiótico sabor morango



2.2. Análises do Produto Acabado

Após o envase os queijos foram armazenados na temperatura de refrigeração (até 10°C) e retirada amostras para realização das análises, sendo: proteína, gordura no ES, teor de umidade e pH, e, de acordo com Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006); coliformes totais, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, fungos filamentosos e leveduras conforme Instrução Normativa nº2 (BRASIL, 2003) e contagens da

bactérias probióticas (COMPENDIUM...,1992; STANDARD...,1992). As Análises físico-químicas e microbiológicas de coliformes totais, *Listéria monocytogenes*, fungos filamentosos e leveduras, assim como o acompanhamento da viabilidade das bactérias lácticas durante o período de armazenamento, foram realizadas no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados da Escola de Medicina Veterinária e Zootécnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e as análises de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonela* spp foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Publica (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média. A viabilidade das bactérias probióticas no produto foi analisada a partir do terceiro dia de produção, e repetida a cada dez dias até completar um mês de fabricação do produto, que corresponde a sua validade comercial.

2.2.1. Análises físico-químicas

2.2.1.1. Proteínas

Determinou-se o percentual de proteínas, através do conteúdo de nitrogênio total do queijo, onde a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico p.a., e posterior destilação com liberação da amônia, que foi fixada com solução ácida e titulada. O procedimento dividiu-se em três etapas, sendo:

Etapa de digestão

Foi pesada 0,25g da amostra em balança analítica e transferida para tubo de Kjeldahl, adicionada 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico p.a., posteriormente aquecido a 50°C por uma hora. Em seguida elevada, gradativamente, a temperatura até atingir 400°C, deixando esfriar e adicionado 10 mL de água.

Etapa da destilação

Foi acoplado ao destilador um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v) com 4 a 5 gotas de solução de indicador misto. Adaptado ao tubo de Kjeldahl ao destilador e adicionado a solução de hidróxido de sódio a 50%, até a amostra se tornar negra (cerca de 20 mL).

Etapa de titulação

Foi titulado com solução de ácido sulfúrico 0,1N, até a viragem do indicador

Resultado: % nitrogênio total = $V \times N \times f \times 0,014 \times 100 / m$

Onde:

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1N

N = normalidade da solução de ácido sulfúrico 0,1N

f = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1N

m = massa da amostra, em gramas

Resultado da proteína: % proteína = % nitrogênio total x F

Onde:

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, F=6,38

2.2.1.2. Gordura no extrato seco

O fundamento desta análise foi quantificar a gordura no extrato seco, onde foi pesado 1g da amostra em béquer de 50 mL, adicionado 10 mL de ácido sulfúrico e aquecido a 60°C. Depois de homogeneizada a solução foi transferida para um butirômetro, lavando o béquer duas vezes com 4 mL de solução de ácido sulfúrico, posteriormente adicionado 1 mL de álcool isoamílico. Agitou-se e transferiu-se para o banho-maria a 65°C por 10 minutos e centrifugou-se durante 5 minutos sendo recolocado no banho-maria por mais 10 minutos. Posteriormente procedeu-se a leitura. O resultado foi expressado pela fórmula:

% gordura = $L \times 11,33 / m$

Onde:

L = leitura do butirômetro

11,33 = massa em gramas do leite

m = massa da amostra, em gramas

2.2.1.3. Teor de umidade

A umidade foi determinada pela perda de massa em condições nas quais água e substâncias voláteis são removidas. O resíduo obtido após evaporação representou os sólidos totais da amostra. No procedimento foi aquecida a cápsula aberta e a tampa na estufa a 102 +/- 2 °C por uma hora. Depois de esfriada a

cápsula tampada em dessecador, até a temperatura ambiente, a mesma foi pesada e adicionada 5 gramas da amostra e acrescentada algumas pérolas de vidro e levada a estufa 102 +/- 2°C por 3 horas. Após este período a tampa foi colocada e levada para ao dessecador para esfriar à temperatura ambiente e pesada. A operação foi repetida por mais 1 hora, resfriada e pesada. O resultado expresso em:

$$\% \text{ umidade} = 100 \times m / m^1$$

Onde:

m = perda da massa em gramas (corresponde à massa inicial do conjunto – cápsula, tampa, pérolas e amostra – subtraída da massa final, após secagem até massa constante)

m¹ = massa da amostra em gramas

2.2.1.4. pH

A determinação do pH da amostra, foi efetuado em medidor de pH-Analyser 300M (Analyser Comércio e Industria Ltda), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo DME-CF (Digimed), onde este parâmetro serve para determinar o grau de fermentação do produto. No procedimento foi calibrado o pHmetro com as soluções tampão pH 4 e 7 e posteriormente inserido o eletrodo na amostra com temperatura de 25°C. O resultado foi indicado no display do equipamento, em unidade de pH.

2.2.2. Análises microbiológicas

2.2.2.1. Número mais provável de coliformes totais (NMP)

Fundamentou-se na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio e caldo verde brilhante bile lactose 2%, em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

A partir de 25 g da amostra do queijo petit suisse com adição de probiótico (retiradas em condições de assepsia), de cada lote, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10⁻¹) utilizando-se o Bag Mixer 400

(Interscience). Em seguida 1 mL da diluição (10^{-1}) foi inoculada em uma série de três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%,. A partir da diluição 10^{-1} , preparou-se a diluição 10^{-2} inoculando-se 1 mL desta em 9 mL de água peptonada a 0,1% em seguida inoculou-se em uma série de três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%,. A diluição 10^{-3} foi preparada a partir da inoculação de 1 mL da diluição 10^{-2} em 9 mL de água peptonada, e em seguida 1 mL desta solução foi inoculada em três tubos contendo 9 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%, Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas (Figura 4) . A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultados positivos, verificou-se o Número Mais Provável (NMP) utilizando a tabela. Os resultados foram expressos em NMP/g ou mL.



Figura 4: Resultado do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais no queijo petit suisse com adição de probiótico.

2.2.2.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

A determinação de *Staphylococcus* foi realizada pelo método da contagem direta em placas. Usando-se as mesmas diluições utilizadas na análise de coliformes, foi inoculado 1 mL de cada diluição em 3 placas contendo Agar Baird Parker. Após a incubação a 35°C por 24 a 48 horas, foram observadas a presença de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus*, sendo realizada a sua

contagem em placas contendo de 20 a 200 colônias. Estas colônias foram confirmadas (5 colônias típicas e 5 atípicas) realizando o teste de catalase. Depois aplicou-se uma formula descrita no método da Instrução Normativa nº2 de 2002 e chega-se ao Número de Unidades Formadora de colônia (UFC) de *Staphylococcus coagulase positiva* por grama da amostra.

2.2.2.3. Pesquisa de Salmonella spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. seguiu a metodologia recomendada Andrews (2012), consistiu das seguintes etapas: (a) pré-enriquecimento da amostra em caldo lactosado, 35 °C por 24 horas; (b) enriquecimento seletivo em caldo tetrionato de sódio e caldo *Rappaport* (42 ± 0,2 °C/24 horas); (c) plaqueamento seletivo diferencial em *Agar* xilose lisina desoxicolato e *Agar* entérico de *Hektoen* com incubação a 35 °C por 24 horas; (d) identificação bioquímica em meio de *Agar* tríplice açúcar ferro (*Agar* TSI) e *Agar* ferro lisina descarboxilase a 35 °C por 24 horas; e (e) confirmação sorológica pela detecção de antígenos somáticos (poli O) flagela res (poli H).

2.2.2.4. Pesquisa de Listeria monocytogenes

A alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada em 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (caldo LEB) e incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. Após incubação transferiu-se 0,1 mL da cultura para um Isolamento e Identificação de patógenos em 11 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Fraser modificado (Caldo MFB), incubado a 35 °C por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, 0,1 mL da cultura foi transferido para placas de Petri contendo 20 mL de ágar Palcam e ágar Oxford e incubadas a 30+/-1°C por 24 a 48 horas e com ágar triptose com ácido nalidíxico 30+/-1°C por 24 horas.

2.2.2.5. Fungos filamentosos e leveduras

Baseia-se na verificação da capacidade desses micro-organismos se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de 25 +/- 1°C.

No procedimento diluiu-se 25 g da amostra em 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}). Em seguida 1 mL desta solução foi transferida para um tubo contendo 9 mL de diluente água peptonada a 0,1%, encontrando a diluição 10^{-2} , seguindo para a diluição 10^{-3} retirando 1 mL da diluição anterior e adicionando a 9 mL de água peptonada a 0,1%. Após fundir o ágar batata glicose e resfriar para 46-48 °C, acidificou-se o meio até pH 3,5, por adição de 1,5 mL de solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio. Verteu-se nas placas cerca de 15 mL de meio de cultura, deixando solidificar em superfície plana, posteriormente inoculou-se 0,1 mL das soluções selecionadas sobre a superfície seca do ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5. Com o auxílio da alça de Drigalski espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio e incubou-se as placas, sem inverter, a 25 +/- 1°C, por 5 dias, em incubadora de BOD. Após este período realizou-se a contagem das placas e os resultados foram expressos em log.UFC/g.

2.2.2.6. Acompanhamento da viabilidade do *Lactobacillus casei* BGP 93 no queijo petit suisse com adição de probiótico

A viabilidade do *Lactobacillus casei* foi monitorada a partir do terceiro dia de produção, e repetida a cada dez dias até completar um mês de fabricação do queijo petit suisse com adição probiótico, que corresponde a validade comercial sugerido para este produto.

A partir de 25 g da amostra do queijo petit suisse com adição de probiótico (retiradas em condições de assepsia), de cada lote, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}) utilizando-se o Bag Mixer 400 (Interscience). A partir desta diluição inicial, prosseguiu com outras diluições decimais até 10^{-8} , utilizando como diluente 9 mL de água péptonada 0,1%. Para a realização da contagem dos lactobacilos utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade “pour plate”, em que inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas, inverteu-se em cada placa 30 mL de Agar MRS (Merck®), previamente fundido e resfriado a 45 °C, misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em movimentos circulares (em sentido horário e anti-horário). Após a semeadura esperou-se solidificar o meio e as placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Placas contendo em 25 a 250

colônias, foram selecionadas para contagem e os resultados expressos como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de amostra.

3. ANÁLISES DOS RESULTADOS

Foi realizada análise descritiva dos resultados. A comparação entre as médias dos lotes foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos resultados e as médias dos dados microbiológicos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e a correlação entre acidez e a contagem das bactérias lácticas, pelo coeficiente de correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises Físico-químicas

Na Tabela 1 Gráficos 1, 2 e 3, observa-se os valores médios de proteína, gordura no extrato seco, umidade e acidez do queijo petit suisse adicionado de probiótico. Os valores encontrados para proteína e umidade estão de acordo com a legislação, tendo em vista que a Portaria n.146-MAPA classifica o queijo petit suisse como um produto de muita alta umidade, a qual não deve ser inferior a 55,0% (BRASIL, 1996). Em relação ao teor de proteína, a legislação cita que deve ser no mínimo 6,0% (BRASIL, 2000). A acidez, embora a legislação não determine padrões é muito importante a sua determinação, pois verifica as condições de vida de prateleira do produto. Pelos resultados encontrados para o teor de gordura, este é considerado como um queijo magro, por está dentro da faixa de 10,0 e 24,0% de matéria gorda estipulada pelo regulamento técnico (BRASIL, 1996).

Tabela 1 - Resultados médios das análises físico-químicas do queijo petit-suisse com adição de probiótico.

Amostra	Proteína	Gordura no Extrato Seco (%)	Umidade (%)	Acidez (pH)
Lote 1	6,74 +/- 0,16	19,36 +/- 0,30	61,44 +/- 1,14	4,17 +/- 0,20
Lote 2	6,59 +/- 0,24	19,03 +/- 0,40	63,62 +/- 0,65	4,21 +/- 0,19
Lote 3	6,68 +/- 0,21	19,50 +/- 0,29	63,80 +/- 0,77	4,20 +/- 0,23

Valores de umidade superiores a esta pesquisa foram encontrados por Maruyama et al.(2006), pesquisando textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e a influência de diferentes combinações de gomas em até 21 dias de estocagem a 4^oC.

Souza et al.(2010), elaboraram queijo petit suisse sabor morango de baixo valor calórico, a partir de concentrações de sacarose e edulcorantes diferentes, e encontraram valores de umidade de 69,77 a 85,33% e o teor de gordura em todas as formulações foi de 0,1%.

Alves (2010), pesquisou o comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico com diversos tratamentos, verificou percentuais de umidade de 60,74 a 64,61.

Veiga et al. (2000), analisando seis marcas de queijo petit suisse, na cidade de Campinas encontraram pH de 4,42 a 4,51, percentual de matéria gorda de 4,47 a 6,22 e proteína de 6,59 a 8,88%.

Veiga e Viotto (2001), estudaram o efeito do tratamento térmico do leite na elaboração de queijo petit suisse por ultrafiltração do leite coagulado e o efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana, obtendo os valores de pH 4,4, matéria gorda 5,8%, e a proteína foi o único componente que variou, de 8,95% com tratamento térmico de 85^oC e de 9,02% quando o aquecimento foi de 72^o C.

Boatto et al. (2010), investigando em Maringá-PR, a composição físico-química do queijo petit suisse de soja enriquecido com cálcio, utilizando soja comum e soja livre de lipoxigenase, encontraram os seguintes resultados: pH 4,3-

4,42, acidez total 6,26-6,02%, umidade 67,53-69,43%, proteína bruta 5,43-4,70% e teor de gordura de 4,27 e 2,92% respectivamente.

Buriti, Cardarelli e Saad (2008), obtiveram em cinco ensaios de queijo fresco cremoso adicionados de *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, após o primeiro dia de armazenamento a 4°C obtiveram percentual de gordura no extrato seco valores que variaram de 21,3 a 28,7%, superiores aos encontrados neste trabalho.

Ong, Henriksson e Shah (2006), desenvolveram um queijo probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium* spp., e avaliaram a influência desta bactéria na atividade proteolítica e produção de ácido orgânico, e encontraram os seguintes resultados para matéria gorda 31,4 - 31,03 -31,89%, teor de proteína 27,46 - 27,70 - 28,07% e pH de 5,40 - 5,14 - 5,12, e umidade de 39,00 – 39,27 e 39,33% nas três bateladas de composições diferentes, os autores afirmam ainda que a composição química do queijo não sofre alteração, porém os resultados demonstraram que houve aumento de aminoácidos livre na atividade proteolítica secundária.

Prudencio et al.(2008),fabricaram queijo petit suisse com retentado de soro e aplicação de extratos de betalaínas e antocianinas para verificarem sua estabilidade em relação ao pH e temperatura, e os resultados médios obtidos para umidade foram de 75,5370.06 a 76.2270.10 %, proteína 6,2270.02 a 6,7170.02, matéria gorda 4,6070.20 a 4,3070.11% , acidez (ácido láctico) 10,4170.01 a 10,7970.12% e pH 4,5570.01 a 4,5770.01, os autores afirmam ainda, que os extratos são estáveis como corantes, e podem ser utilizados em queijos pois não modificaram a composição do produto, apenas uma amostra apresentou diminuição do conteúdo de proteína.

Ong e Shah (2009), elaboraram queijo cheddar probiótico, avaliando a influencia das temperaturas de cura na sobrevivência dos micro-organismos probioticos, composição dos queijos e perfis dos ácidos orgânicos, após 24 semanas observaram diminuição do teor de umidade e aumento no teor de proteína e gordura. Em relação aos ácidos orgânicos houve aumento durante o processo de cura de todos os ácidos e com maior abundância o ácido láctico.

Ong, Henriksson e Shah (2007), pesquisaram influencia das cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus*

casei ou *Bifidobacterium ssp.* na atividade proteolítica e perfis de ácidos orgânicos em queijo cheddar probiótico, o estudo demonstrou que adição de probióticos não tem efeito nos teores de gordura, proteína e pH, apenas aumenta o teor de umidade dos queijos.

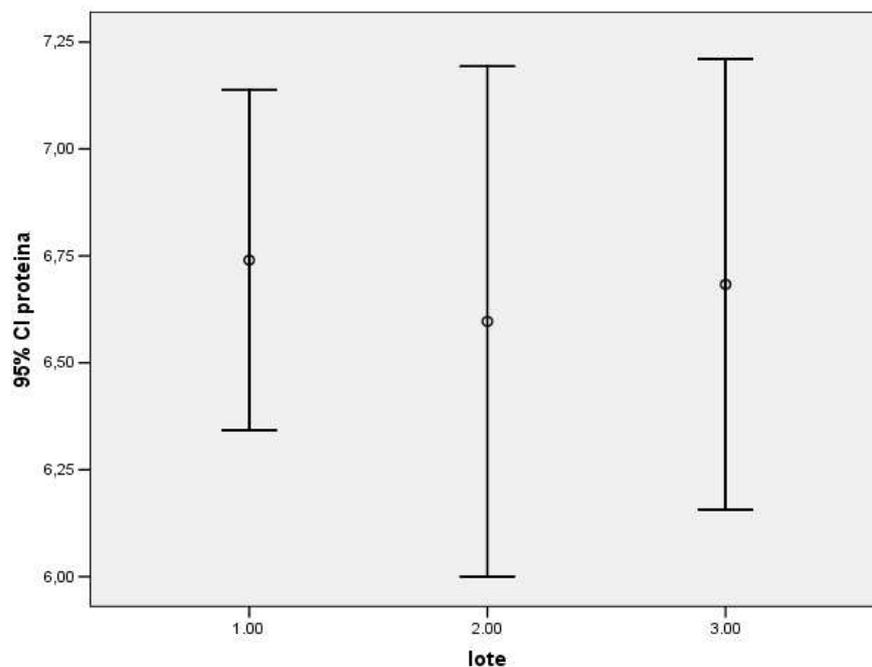


Gráfico 1 - Valores médios da determinação do percentual de proteína no queijo petit suisse adicionado de probiótico.

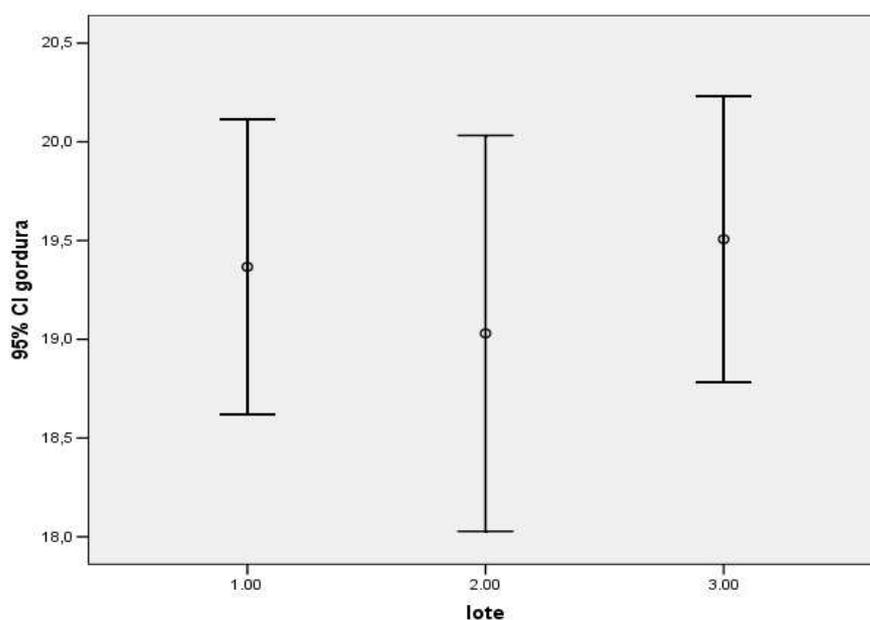


Gráfico 2 - Valores médios da determinação do percentual de gordura no queijo petit suisse adicionado de probiótico.

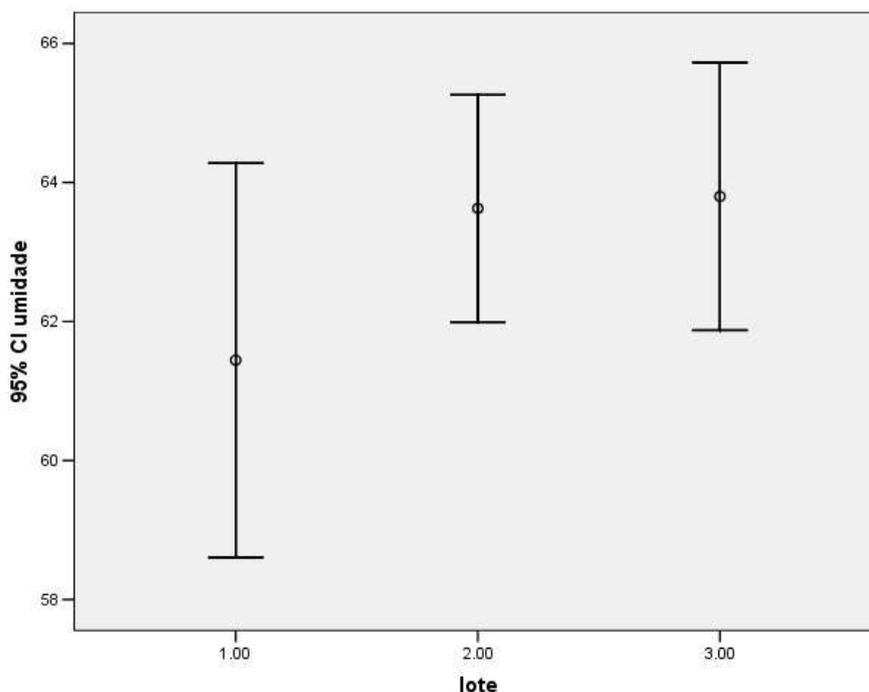


Gráfico 3 - Valores médios da determinação do percentual de umidade no queijo petit suisse adicionado de probiótico.

4.2. Análises microbiológicas

A Tabela 2 apresenta os resultados da qualidade microbiológica do queijo petit suisse probiótico. Pode observar que todos os parâmetros microbiológicos exigidos pela Portaria n. 146 de 07 de março de 1996 atendem a esta resolução.

Estes resultados se devem a aplicação de boas práticas de fabricação durante todo o processo de elaboração, em que controlou-se a higiene dos utensílios, manipulador e também da matéria-prima, como também ao pH do meio, que por ser ácido impede o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis. Com relação a presença de fungos filamentosos e leveduras, são originários do ambiente, os valores encontrados não são preocupantes por estarem abaixo do limite permitido pela legislação (BRASIL, 1996).

Buriti (2005), pesquisando três formulações de queijo probiótico observou as maiores contagens de fungos aos 21 de estocagem dos produtos, enquanto coliformes e *Staphylococcus* estiveram presente durante todas as etapas do processamento de elaboração e estocagem do produto.

A legislação determina para os queijos de muita alta umidade (>55%) com adição de bactérias lácticas em forma viável e abundantes, a exemplo do queijo petit suisse elaborado neste estudo, os limites máximos de 10^3 UFC/g de coliformes totais e 10^2 UFC/g de coliformes termotolerantes, 10^2 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva, 5×10^3 de bolores e leveduras e ausência em 25 gramas de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 1996).

Dabiza e El Deib (2007), avaliaram queijo macio com adição de probiótico e verificaram que após 30 dias de maturação desaparecem coliformes totais e *Staphylococcus* spp., como também os fungos em 15 dias. Entretanto, Osman, Abbas (2001), encontraram a presença de leveduras em queijos probióticos, enquanto as bactérias coliformes e fungos não foram detectadas em queijos probióticos.

Tabela 2 - Resultados da qualidade microbiológica do queijo petit suisse com adição de probiótico.

Amostra	Coliformes Totais (NMP)	<i>Stphylococcus</i> coagulase Positiva	<i>Salmonella</i> ssp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fungos filamentosos e leveduras log.UFC.g ⁻¹
Lote 1	< 0,3	< 10	Ausente	Ausente	0,85 +/- 0,217
Lote 2	< 0,3	< 10	Ausente	Ausente	1,08 +/- 0,150
Lote 3	< 0,3	< 10	Ausente	Ausente	0,96 +/- 0,057

4.3. Acompanhamento da viabilidade do *Lactobacillus casei* BGP 93

A população viável dos lactobacilos adicionados no queijo petit suisse durante o seu período de armazenamento sob refrigeração está demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das contagens da população viável dos lactobacilos no queijo petit suisse com adição de probiótico.

Amostra	* Contagem dos <i>Lactobacillus casei</i> BGP 93 log.UFC.g ⁻¹			
	Dias de estocagem			
	3 dias	13 dias	23 dias	33 dias
Lote 1	8,66 +/- 0,05	8,75 +/- 0,03	8,76 +/- 0,04	8,65 +/- 0,03
Lote 1	8,63 +/- 0,01	8,72 +/- 0,02	8,69 +/- 0,01	8,61 +/- 0,05
Lote 3	8,66 +/- 0,02	8,74 +/- 0,03	8,69 +/- 0,03	8,61 +/- 0,04

De acordo com os resultados visualizados na Tabela 3 e ilustrado no Gráfico 4 e Figura 5, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as contagens dos *Lactobacillus casei* BGP 93 adicionado no queijo petit suisse durante todo o seu período de armazenamento que correspondeu a 30 dias, assim como não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os lotes.

Como pode ser observado na Tabela 3 e Gráfico 4, aos 30 dias de estocagem em temperatura de 4°C, a população de *Lactobacillus casei* BGP 93 encontrada nos três lotes, estava dentro dos parâmetros recomendados pela legislação, embora vários pesquisadores têm indicado que uma concentração mínima de 1×10^6 UFC g⁻¹ do produto é suficiente para exercer um efeito probiótico (Ravula, Shah, 1998; Shah, 2000 e 2001). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o queijo petit suisse é um bom veículo, para *Lactobacillus casei* BGP 93, e mesmo com a redução da acidez estes permaneceram viáveis no queijo.



Figura 5 - Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Lactobacillus casei* BGP 93

Buriti, Rocha e Saad (2005), pesquisaram a sobrevivência de *L. acidophilus* em queijo Minas frescal elaborado com acidificação direta com ácido láctico e adição de bactérias mesofílicas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Nos dois tipos de queijo, a cultura probiótica ficou viável durante 21 dias de estocagem, no entanto, no queijo contendo a cultura mesofílica, as contagens de *Lactobacillus acidophilus* foram ligeiramente superiores, sugerindo um sinergismo entre os micro-organismos.

Ribeiro, Simões e Jurkiewicz (2009), desenvolveram queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, produzido a partir de retentados de ultrafiltração, inocularam 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC.g⁻¹ de *L. acidophilus*, a contagem das bactérias probióticas foi efetuada em intervalos de 7 dias durante sua estocagem por 28 dias, o decréscimo da população de *L. acidophilus* não foi significativo para os três queijos avaliados.

Vinderola et al. (2000), produziram queijos fresco com retentado obtido por ultrafiltração, usando diferentes combinações de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* com culturas probióticas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, e encontraram um decréscimo da população *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* a qual foi menor que 1 ciclo logarítmico, entretanto a população de *Lactobacillus casei* permaneceu constante durante 60 dias de estocagem sob refrigeração.

A influência de culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* ou *Bifidobacterium* sp. na atividade proteolítica e no perfil de ácido orgânico em queijo cheddar probiótico, após seis dias de maturação a 4°C, foi pesquisada e os resultados demonstram que todos os micro-organismos permaneceram a um nível elevado de $>8.0 \log_{10}$ UFCg⁻¹, porém a concentração de ácido acético foi maior nos queijos adicionados de *Bifidobacterium longum* 1941, *Bifidobacterium lactis* LA FTI[®] B94, *Lactobacillus casei* 279 e *Lactobacillus paracasei* LAFTI[®] L26, porém não foi observado diferença significativa no nível de ácido acético, quando foi adicionado o *Lactobacillus acidophilus* e no queijo controle (ONG, HENRIKSSON e SHAH, 2007).

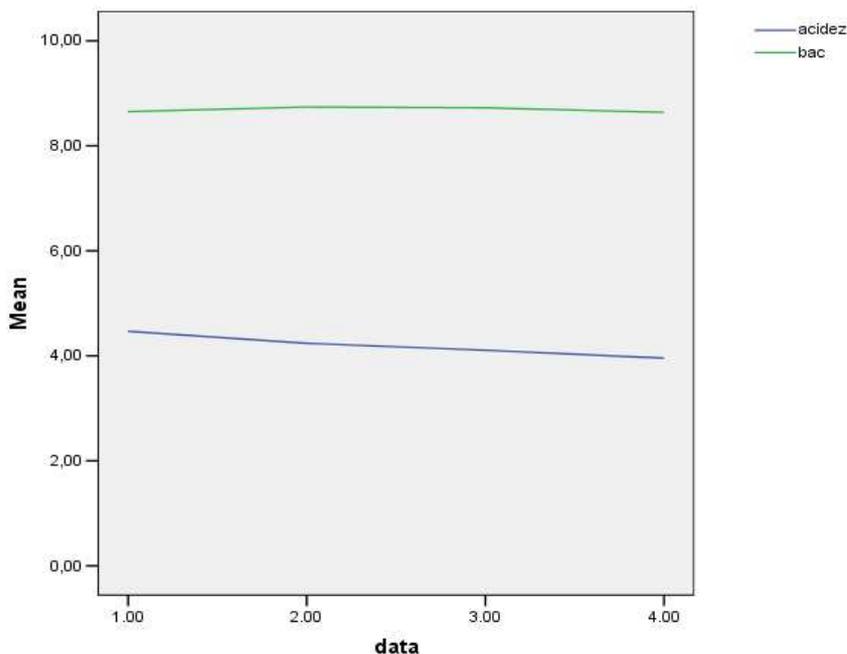


Gráfico 4 - Resultados da relação da acidez com a curva de sobrevivência de *Lactobacillus casei* BGP 93.

Com relação a curva de sobrevivência (gráfico 4) observa-se que a população permaneceu estável desde o início da produção até o prazo de validade sugerido para o produto, permanecendo com uma população viável na faixa de 8,66 log.UFC/g ($4,0 \times 10^8$ UFC/g).

A recomendação brasileira (BRASIL 2002) mais recente para alimentos probióticos é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado 10^8 a 10^9 UFC/dia. Portanto sugere-se que o produto em estudo seja consumido na quantidade de 60 g para que o indivíduo possa ingerir uma porção diária na faixa de 10^9 UFC do micro-organismo probiótico. Essa quantidade é o bastante para proteger o organismo das enfermidades causadas por outros micro-organismos. Vale ressaltar que o consumo excessivo destes micro-organismos probióticos pode causar um desconforto intestinal além do fornecimento do excesso de calorias que pode prejudicar na eliminação de peso.

Na tabela 4 observa-se os valores médios do pH do queijo petit suisse com adição de probiótico durante o período de estocagem.

Tabela 4 - Valores médios de pH do queijo petit suisse probiótico durante o período de estocagem.

Amostra	3 dia	13 dia	23 dia	33 dia
Lote 1	4,46 +/- 0,11	4,13 +/- 0,06	4,13 +/- 0,06	3,96 +/- 0,06
Lote 2	4,46 +/- 0,05	4,26 +/- 0,06	4,16 +/- 0,06	3,96 +/- 0,06
Lote 3	4,46 +/- 0,15	4,26 +/- 0,15	4,16 +/- 0,15	3,93 +/- 0,11

Analisando a Tabela 4 observa-se que não houve variação significativa ($p>0,05$) do pH no substrato do petit suisse com adição de probiótico durante o período de estocagem do produto, apresentando a mesma resposta para a viabilidade das células dos lactobacilos incorporados no produto.

A viabilidade de probiótico numa matriz alimentícia depende de muitos fatores, como o tipo da cultura que será adicionada ao produto, interação com outros micro-organismos existentes no alimento, produção de peróxido de hidrogênio durante o metabolismo bacteriano e acidez final do produto (VASILJEVIV, SHAH, 2008).

O pH do substrato ficou na faixa 4,2 em decorrência da produção de ácido láctico proveniente da proliferação do lactobacilos incorporado no produto. A produção deste ácido não atingiu níveis mais elevados, provavelmente em decorrência da capacidade tamponante dos nutrientes presentes no leite (fosfatos, citratos e peptonas). Embora a acidez seja um fator limitante para o desenvolvimento de muitos micro-organismos, o *Lactobacillus casei* BGP 93 não foi afetado por este fator devido esta linhagem ser ácido tolerante, resistindo ao pH 3,0 conforme indicado na especificação técnica da cultura, pelo fabricante (anexo 1).

5. CONCLUSÃO

O queijo petit suisse mostrou ser um bom veículo para adição de micro-organismo probiótico, especialmente *Lactobacillus casei*. O *Lactobacillus casei* se manteve viável durante a vida de prateleira, mesmo com a diminuição do pH, podendo o queijo ser considerado um produto funcional durante 30 dias de armazenamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: Origem e Tecnologia**. Juiz de Fora: CT/ILCT/EPAMIG, V.2, 2002 130p.

ALVES, C. C. C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidóphilus* e de acidificação direta com ácido láctico**. 2010.Dissertação (Mestre) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

ANDREWS, W. A.; HAMMACK, T. S posting date. *Salmonella*. In G. J. Jackson et al. (ed.), Bacteriological analytical manual online.Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration,Gaithersburg, MD. http://www.cfsan.fda.gov/_ebam/bam-5.html. S.December 2007, acesso em setembro de 2012.

BOATTO, D. A. et al. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo petit-suisse de soja comum e de soja livre de lipoxigenase, enriquecidos com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.30, n.3, jul/set. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 146 de 07 de mar de 1996 Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo petit-suisse. **Instrução Normativa**, n.º53 de 29 de dezembro de 2000. Brasília., 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC n° 2 de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde., 2002

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n.62 de 26 agosto de 2003. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa**, n.68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília, 2006.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. N. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.44, n.1,jan/fev. 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 sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.12, n.15, p.1279-1288, 2005.

BURITI, F. C. A. Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico. 2005. Dissertação (Mestre) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciência Farmacêutica. São Paulo, 2005, 72 p.

COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

DABIZA, N.; EL-DEB, K. Biochemical evaluation and microbial quality of ras cheese supplemented with probiotic strains. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. v.5, n.3, p.295-300, 2007.

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

KELLY, A.L.; O'DONNELL, H.J. Composition, gel properties and microstructure of quarg as affected by processing parameters and milk quality. **International Dairy Journal**, v.8, p. 295-301, 1998.

MARUYAMA, L. Y. et al. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influencia de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26, n.2, p.386-393, abr/jun. 2006.

ONG, L.; A. HENRIKSSON, A.; SHAH, N, P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal** v.16, p. 446–456, 2006.

ONG, L.; A. HENRIKSSON, A.; SHAH, N, P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium sp.* **International Dairy Journal**, v.17, p. 67–78, 2007.

ONG, L.; A. HENRIKSSON, A.; SHAH, N, P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium sp.* **International Dairy Journal** v.17, p. 937–945, 2007.

ONG, L.; SHAH, N, P. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **LWT - Food Science and Technology**. v.42, p. 1260–1268, 2009.

OSMAN, M. M.; ABBAS, F.M. Fate of *Lactobacillus acidophilus* La and *Bifidobacterium latis* Bb-12 in probiotic Ras cheese. Proceeding of the 8th. **Egyptian Conference for Dairy Science & Technology**. p. 653-604, 2001.

PRUDENCIO, I. D. et al. Petit suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. **LWT - Lebensmittel Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology**, v.41, p.905-910, 2008.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPERT, A.M.; FILHO, A.D.R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**. Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RAVILA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yoghurts and fermented milk. **Biotechnology Technigues**, v.12, p.819-822, 1998.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICZ C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.29, n.1, p. 19-23, jan/mar, 2009.

SHAH, N. P. Probiotic bactéria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v.83, n.4, p.894-907, 2000.

SHAH, N. P. Functional foods, probiotics and prebiotics. **Food Technology**. v.55, p. 46-53, 2001.

SOUZA, J. C. B.; GUERGOLETTTO, K. B.; GARCIA, S.; SIVIERI, K. Viabilidade da adição de *Lactobacillus casei* (LC-1) protegido com trealose e goma acácia em sorvetes. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 2, p. 231-237, abr./jun. 2011.

SOUZA, V. R. et al. Elaboração de queijo petit-suisse sabor morango de baixo valor calórico. . **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 65, n. 374, p. 49 – 58, mai/jun, 2010.

STANDARD methods for the examination of dairy products. 16 ed. Washington:American Public Health Association, 1992. 546 p.

VAN DENDER, A. G. F. et al. Adaptação de tecnologia de fabricação e termização do queijo quark. . **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 40, n. 239, p. 33 – 53, 1985.

VASILJEVIC, T. SAHA, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives, **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p. 714-728, 2008.

VEIGA, P. G. et al. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit-suisse brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.20, n.3, set/dez, 2000.

VEIGA, P. G.; VIOTTO, W. H. Fabricação de queijo petit-suisse por ultrafiltração do leite coagulado. Efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.21, n.3, set/dez, 2001.

VINDEROLA, C. G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**. v 83, n.9, p 1905-1911, set. 2000.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*

ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO PETIT SUISSE COM ADIÇÃO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei*

Autor: Nelson de Carvalho Delfino

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais, como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. As indústrias de alimentos têm buscado identificar e atender os anseios dos consumidores em relação a seus produtos, pois só assim sobreviverão no mercado cada vez mais competitivo. A análise sensorial tem-se mostrado importante ferramenta neste processo, envolvendo um conjunto de técnicas diversas elaboradas com o intuito de avaliar um produto quando a sua qualidade sensorial, sendo os testes de aceitação usados quando a finalidade é avaliar se os consumidores gostam ou desgostam do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitação por parte dos consumidores de um queijo petit suisse com adição do probiótico *Lactobacillus casei* BGP 93, a fim de identificar a qualidade e a potencialidade do produto no mercado de alimentos funcionais, onde foi aplicado o teste de aceitação utilizando a técnica da Escala Hedônica de 9 pontos, facilmente compreendida pelos consumidores. Dentre os 120 indivíduos que participaram do teste de aceitação, a maioria pertencia ao sexo feminino representando (57,5%) e se encontravam na faixa etária entre 18 e 66 anos de idade. De acordo com os resultados encontrados, conclui-se que este produto teve uma boa aceitação e surge como um produto inovador dentre os derivados lácteos. Além disto, o produto apresenta uma proposta interessante para o mercado de lácteos tendo em vista a adição de probióticos, e se relaciona com uma demanda crescente por alimentos saudáveis e nutritivos.

Palavras-chave: análise sensorial, escala hedônica, alimento funcional.

SENSORY ANALYSIS OF PETIT SUISSE CHEESE WITH ADDITION OF PROBIOTIC *Lactobacillus casei*

Author: Nelson de Carvalho Delfino

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: When the purpose is to evaluate whether the consumers like or dislike of product. The aim of this study was to evaluate the acceptance by consumers of a petit suisse cheese with probiotic *Lactobacillus casei* addition of BGP 93, to identify the quality and capability of the product in the functional The tasting methods to assess food, were employed for the first time long ago, in Europe, in order to control the quality of breweries and distilleries in the United States, with the need to produce quality food and that were not rejected by the soldiers, then emerging methods of tasting. Sensory analysis is defined by the Brazilian Association of Technical Standards as a scientific discipline used to evoke, measure, analyze and interpret reactions to the characteristics of foods and materials as they are perceived by the senses of sight, smell, taste, touch and hearing. The food industries have sought to identify and meet the desires of consumers in relation to their products, so because only survive in an increasingly competitive market. Sensory analysis has shown important tool in this case, involving a range of various elaborate techniques in order to evaluate a product when their sensory quality, and the acceptance tests used food market, where we applied the acceptance test using Technique of Hedonic Scale of 9 points, easily understood by consumers. Among the 120 individuals who participated in the test acceptance , most belonged to females representing (57.5%) and were aged between 18 and 66 years of age. According to the results, it is concluded that this product had good acceptance and emerges as an innovative product from the dairy products. Furthermore, the product has an interesting proposal for the dairy market with a view to adding probiotics, and relates to a growing demand for healthy and nutritious food.

Keywords: sensory analysis, hedonic scale, functional food.

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de degustação, para avaliar os alimentos, foram empregados pela primeira vez há muito tempo atrás, na Europa, com a finalidade de controlar a qualidade de cervejarias e destilarias. Durante a Segunda Guerra Mundial, nos Estados Unidos, surgiu a necessidade de produzir alimentos de qualidade e que não fossem rejeitados pelos soldados, surgindo então os métodos de degustação, estabelecendo a análise sensorial como base científica. No Brasil, essa prática chegou em 1954 no laboratório de degustação da seção de Tecnologia do Instituto Agrônomo de Campinas/SP, para avaliar o café (MONTEIRO, 1984; CHAVES, 1998).

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais, como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

Estudos recentes enfatizam uma relação intrínseca entre dieta e saúde, mobilizando a indústria alimentícia ao desenvolvimento de novos produtos cujas funções pretendem ir além do fornecimento de nutrientes básicos e da satisfação do paladar do consumidor (BEHRENS e SILVA, 2004).

O volume de vendas de produtos lácteos no Brasil é bastante significativo, tendo aumentado muito nos últimos anos. Paralelamente, observa-se um perfil de consumidor cada vez mais exigente, não apenas do ponto de vista nutricional e de aceitabilidade global, como também em termos de benefícios adicionais à saúde e os alimentos funcionais suprem esta exigência ao proporcionar benefícios a quem os consome. Bactérias probióticas vêm sendo empregadas em produtos visando à promoção de efeitos benéficos no organismo. A formulação de um novo produto “petit suisse”, com adição de bactérias probióticas e não existente no mercado atual, visa aumentar a variedade de alimentos funcionais e atender para um nicho ainda não explorado (MARAYAMA et al., 2006).

Os alimentos adicionados de micro-organismos probióticos e de prebióticos podem proporcionar o controle da microbiota intestinal, ajudando na melhoria da qualidade de vida e bem estar dos idosos (SAAD, 2006).

As indústrias de alimentos têm buscado identificar e atender os anseios dos consumidores em relação a seus produtos, pois só assim sobreviverão no

mercado cada vez mais competitivo. A análise sensorial tem-se mostrado importante ferramenta neste processo, envolvendo um conjunto de técnicas diversas elaboradas com o intuito de avaliar um produto quanto a sua qualidade sensorial, em várias etapas de seu processo de fabricação. É uma ciência que objetiva, principalmente, estudar as percepções, sensações e reações do consumidor sobre as características dos produtos, incluindo sua aceitação ou rejeição. Os testes de aceitação são usados quando a finalidade é avaliar se os consumidores gostam ou desgostam do produto (MINIM, 2006).

Os testes de aceitação requerem equipe com grande número de participantes que representam a população de consumidores atuais ou potenciais do produto. Entre os métodos mais usados para medir a aceitação de produtos está a Escala Hedônica, onde o consumidor expressa sua aceitação seguindo uma escala previamente estabelecida, que varia gradativamente entre os termos gosta e desgosta (CHAVES e SPROESSER, 1993).

Tendo em vista a escassez de trabalhos e por não haver referências na legislação brasileira sobre este produto, existem poucas informações sobre as características do queijo petit suisse nacional. A avaliação sensorial possibilitará analisar possíveis diferenças de consistência e sabor que poderão refletir na aceitação do consumidor.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitação por parte dos consumidores de um queijo petit suisse com adição do probiótico *Lactobacillus casei* BGP 93, a fim de identificar a qualidade e a potencialidade do produto no mercado de alimentos funcionais.

2. MATERIAL E MÉTODO

A análise sensorial do queijo petit suisse com adição do probiótico *Lactobacillus casei* foi realizada no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados, na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia – UFBA, no dia 12 de dezembro de 2012 com 120 degustadores não treinados, onde foi aplicado o teste de aceitação utilizando a técnica da Escala Hedônica de 9 pontos, facilmente compreendida pelos consumidores. Nela o consumidor expressa sua aceitação pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida que varia gradativamente, com base nos atributos

“gosta e “desgosta” com escores variando de 1 gostei extremamente até 9 desgostei extremamente. Cada provador foi encaminhado até o laboratório onde recebeu uma bandeja contendo aproximadamente 25g do produto em copinho plástico, um copo de água mineral em temperatura ambiente para que os provadores lavassem o palato, um guardanapo e a ficha, que deveria ser preenchida após a ingestão da amostra. Foram avaliadas amostras de queijo petit suisse adicionado de probiótico dos três lotes apresentados aleatoriamente aos provadores e requerido aos mesmos que expressassem sua percepção com relação ao produto e que fizessem algum comentário sobre o produto, para tal foi aplicado o seguinte questionário:

FICHA DE AVALIAÇÃO

NOME:

DATA:

SEXO: () ()

IDADE: **ANOS**

Por favor, avalie a amostra servida e indique o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a resposta que melhor reflita seu julgamento.

Amostra: 25 g de queijo petit suisse adicionado de probiótico

- () Gostei extremamente.
- () Gostei muito.
- () Gostei moderadamente.
- () Gostei ligeiramente
- () Indiferente.
- () Desgostei ligeiramente.
- () Desgostei moderadamente.
- () Desgostei muito.
- () Desgostei extremamente.

Comentários:

Figura 1 - Ficha utilizada na avaliação das amostras de queijo petit suisse adicionado de probiótico.

3. ANÁLISES DOS RESULTADOS

Foi realizada análise descritiva das frequências.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil dos Consumidores

Dentre os 120 indivíduos que participaram do teste de aceitação, a maioria pertencia ao sexo feminino representando (57,5%) e se encontravam na faixa etária entre 18 e 66 anos de idade.

Neste trabalho, o produto desenvolvido apresentou boa aceitação global, uma vez que 100 % dos provadores atribuíram escore entre 1 e 4, onde 1 é gostei extremamente, 2 gostei muito, 3 gostei moderadamente e 4 gostei ligeiramente, sendo o mais pontuado o escore 2 com uma frequência de 53 provadores, ou seja, 44,2%, seguido do escore 1 com 30%, o escore 3 com 23,3% e o escore 4 com 2,5% (Tabela 1 e Gráfico 1).

De acordo a análise descritiva das frequências (Tabela 1), confirma-se a boa aceitação do produto, se este produto fosse lançado no mercado, provavelmente 100% dos consumidores comprariam.

A adição de micro-organismos probióticos já foi testada em diversos alimentos lácteos ou não. A aceitação dos produtos e a percepção de diferença com relação aos produtos sem estes componentes variam entre as pesquisas e conforme os alimentos analisados e a faixa etária pesquisada (MEILGAARD et al., 2007).

Santini (2008), desenvolveu um queijo cremoso sabor tomate seco adicionado de *Lactobacillus paracasei*. O queijo probiótico não diferiu sensorialmente do queijo controle e o produto obteve boa aceitação e intenção de compra pelos participantes dos testes.

Tabela 1 - Análise descritiva das frequências dos escores dos provadores do queijo petit suisse adicionado de probiótico.

Escore escala hedônica	Frequência	Percentual
1 gostei extremamente	36	30
2 gostei muito	53	44,2
3 gostei moderadamente	28	23,3
4. gostei ligeiramente	3	2,5
Total	120	100

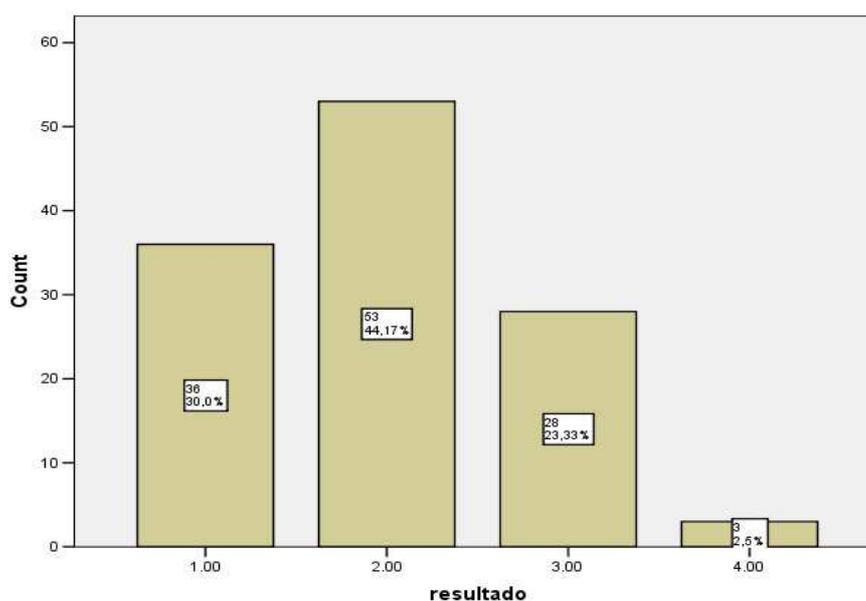


Gráfico 1: Resultados da frequência de 120 provadores do queijo Petit suisse adicionado de probiótico.

Dos 120 provadores 61 fizeram comentários, sendo todos, ou seja 100% foram positivos, dentre os atributos sensoriais os que mais influenciaram na aceitação do produto foram a textura, o teor de açúcar e acidez.

Martin-Diana et al. (2003), desenvolvendo leites fermentados de cabra contendo bactérias probióticas observaram em análise sensorial que as críticas

mais comuns estiveram relacionadas à mais alta acidez, textura semilíquida dos produtos e gosto não-típico.

Os probióticos podem afetar algumas propriedades como a textura implicando proteólises da caseína além de influenciar na acidificação do leite e do queijo (ONG et al., 2007).

Segundo Sousa, Ardo e McSweeney, (2001), a proteólise no queijo durante o processo de maturação é um fator importante, por desempenhar papel direto e crítico no sabor do queijo e textura, além de desenvolver características sensoriais típicas no produto.

5. CONCLUSÃO

De acordo com o resultado da análise sensorial, conclui-se que este produto teve uma boa aceitação e surge como um produto inovador dentre os derivados lácteos. Além disto, o produto apresenta uma proposta interessante para o mercado de lácteos tendo em vista a adição de probióticos, e se relaciona com uma demanda crescente por alimentos saudáveis e nutritivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas: terminologia**. 1993. 8 p.

BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n.3, jul/set, 2004.

CHAVES, J. .B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993, 81 p.

CHAVES, J. B. P. **Análise sensorial: histórico e desenvolvimento**. Viçosa: Editora UFV, 1998, 31 p. (caderno 32).

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

MARAYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Avaliação sensorial de queijo “petit-suisse” potencialmente probiótico adicionado de diferentes gomas. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC** - Florianópolis, SC - Julho/2006.

MARTIN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. . Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**,v.13, n.10,p. 827–833.2003.

MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: Editora UFV, 2006, 225 p..

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de Avaliação sensorial**. 2 ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, CEPPA, 1984. 101p.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**,v.17,p.937–945, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 53-69,2006.

SANTINI, M.S.S. **Viabilidade de L. paracasei em queijo cremoso sabor tomate seco**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Universidade Norte do Paraná. Londrina. 2008.

SOUSA, M.J.; ARDO, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p.327–345, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de leite em pó desnatado analisadas pode se afirmar que estão de acordo com a legislação. Não foi detectada a presença de microrganismos indesejáveis nem resíduos antimicrobianos, que é um resultado satisfatório, pois não irá interferir no processo fermentativo do produto. A pesquisa de resíduos de antibióticos nas amostras ratifica a importância de análises periódicas para evitar que a população fique exposta aos resíduos de antimicrobianos. A ausência de microrganismos indesejáveis reforça a importância da aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) a fim de garantir inocuidade e segurança alimentar. Os resultados das análises físico-químicas confirmam a qualidade satisfatória do leite em pó desnatado e do queijo petit suisse com adição de probiótico oferecido para o consumo. O queijo petit suisse mostrou ser um bom veículo para adição de micro-organismo probiótico, O *Lactobacillus casei* se manteve viável durante a vida de prateleira, mesmo com a diminuição do pH. O produto apresenta uma proposta interessante para o mercado de lácteos tendo em vista que os produtos funcionais se relacionam com uma demanda crescente por alimentos saudáveis e nutritivos.