

# VIABILIDADE DO *Lactobacillus casei* ssp. *casei* EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL E A COMPETIÇÃO COM *Staphylococcus aureus*

ZAGO, Danila<sup>1</sup>;  
SANTOS, Isabela Carvalho dos<sup>2</sup>;  
ALVES, Gilberto<sup>3</sup>;  
GONÇALVES, Daniela Dib<sup>4</sup>;  
MARTINS, Lisiane de Almeida<sup>5</sup>

## RESUMO

Vários alimentos podem ser veículos de micro-organismos probióticos, entre eles diversos tipos de queijos, incluindo os queijos frescos. Os queijos destacam-se no Brasil, por seu alto consumo principalmente o queijo tipo Minas Frescal. O objetivo desse trabalho foi verificar o processo competitivo do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, com o micro-organismo probiótico, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* em queijo tipo Minas Frescal nos tempos de zero, sete, 14 e 21 dias armazenamento a uma temperatura de 5°C. Os queijos tipo Minas Frescal foram produzidos a partir de leite pasteurizado comercial e integral, utilizando 15 litros de leite para cada fabricação e com adição direta de ácido láctico, para serem fabricados quatro tipos diferentes de queijo minas frescal: um queijo padrão (controle), um queijo com adição de *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, outro com *Lactobacillus casei* ssp. *casei* e *Staphylococcus aureus* e um somente com adição *Staphylococcus aureus* onde todos os produtos foram fabricados em triplicata. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata utilizando o meio BP (*Baird Parcker*) para identificação de colônias de *Staphylococcus aureus* e MRS (*Man Rogosa and Sharpe*) para a identificação de *Lactobacillus* nos tempos zero, sete, 14 e 21 dias de maturação a uma temperatura 5°C. Observou-se com os dados obtidos que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da diminuição dos micro-organismos *S. aureus* pelos micro-organismos probiótico *L. casei* ssp. *casei*.

**PALAVRA-CHAVES:** Micro-organismos Patógenos. Micro-organismo Probiótico. Análises Microbiológicas.

## FEASIBILITY OF *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IN CHESES MINES FRESH AND COMPETITION WITH *Staphylococcus aureus*

## ABSTRACT

Several food products can be vehicles of probiotic micro-organisms among them various types of cheese, including fresh cheese. The cheeses stand out in Brazil, by its high consumption mainly the cheese kind Minas Frescal. The aim of this study was to investigate the competitive process of the micro-organism *Staphylococcus aureus*, with the micro-organism probiotic, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in cheese Minas Frescal at time zero, seven, 14 and 21 days storage at a temperature of 5 ° C. The cheeses kind Minas Frescal were made from pasteurized, commercial and whole milk, using 15 liters of milk for each manufacturing and direct addition of lactic acid to be made four different types of minas frescal cheese: a standard (control) cheese, a cheese with addition of *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, another with *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Staphylococcus aureus* and one only with added *Staphylococcus aureus* where all products were made in triplicate. All microbiological analyzes were performed in triplicate using the mean BP (*Baird Parcker*) to identify colonies of *Staphylococcus aureus* and MRS (*Man Rogosa and Sharpe*) for the identification of *Lactobacillus* in time zero, seven, 14 and 21 days of ripening to a temperature 5° C. observed with the data obtained that there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) decrease of micro-organism *S. aureus* by micro-organism proiotic *L.casei* ssp. *casei*.

**KEYWORDS:** Microorganisms Pathogens. Probiotic microorganism. Microbiological Analysis.

<sup>1</sup>Colégio Agrícola Estadual de Umuarama, Secretária de Estado da Educação. Estrada da Paca, bairro São Cristóvão - 87500-000 - Umuarama, PR – Brasil. [zagodanila@hotmail.com](mailto:zagodanila@hotmail.com)

<sup>2</sup>Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Universidade Paranaense (UNIPAR) - Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 - Centro - CEP: 87502-210, Umuarama, PR - Brasil. [isabela\\_carvalhoxd@hotmail.com](mailto:isabela_carvalhoxd@hotmail.com)

<sup>3</sup>Docente da Universidade Paranaense (UNIPAR) - Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 - Centro - CEP: 87502-210, Umuarama, PR - Brasil. [giodroggo@gmail.com](mailto:giodroggo@gmail.com)

<sup>4</sup>Docente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Universidade Paranaense (UNIPAR) - Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 - Centro - CEP: 87502-210, Umuarama, PR - Brasil. [danieladib@prof.unipar.br](mailto:danieladib@prof.unipar.br)

<sup>5</sup>Médica Veterinária Autônoma. [lisiane.almeida.martins@gmail.com](mailto:lisiane.almeida.martins@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande aumento na 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). Além disso, o crescimento pela demanda por alimentos saudáveis tem estimulado a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria internacional (SAARELA *et al*, 2000), dentre os quais destacam-se os alimentos probióticos.

Os alimentos funcionais são alimentos modificados (compreendendo também os ingredientes alimentares), semelhante aos alimentos convencionais, que além de promoverem funções nutricionais básicas, exercem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro, úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônicas degenerativas (LAJOLO, 1999; BERGAMINI *et al*, 2005; MICHIDA *et al*, 2006).

Os alimentos, que fazem parte do grupo de chamados funcionais, contêm micro-organismos vivos específicos que exercem efeito benéfico sobre o hospedeiro, ou seja, têm a capacidade de alterar a microbiota intestinal do hospedeiro e, conseqüentemente, a sua saúde (PUPIN, 2002).

Dentre os benefícios à saúde produzidos por bactérias probióticas, podem-se citar: redução da intolerância à lactose; inibição de micro-organismos patogênicos; prevenção de diarreia; redução dos níveis de colesterol; aumento da resposta imunológica e prevenção de câncer de cólon e ação satisfatória na modulação da resposta alérgica (SAARELA *et al*, 2002; SANDERS, 2003).

Os aspectos importantes que caracteriza um micro-organismo para que se apresente como probiótico, por meio da avaliação do efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos, no qual a sua ação direta ocorre pela produção de substâncias antimicrobianas, apresentando efeito inibitório ou letal para o patógeno (VANDENBERG, 1993), e indireto pela inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, seja devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão (CZERUCKA; RAMPAL, 2002), competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (BRANDÃO *et al*, 1998).

Os queijos, em geral, apresentam algumas vantagens em relação a outros produtos probióticos. A maioria possui pH mais elevado que iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas por um período mais longo. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem uma proteção para a bactéria probiótica durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (GARDINER *et al*, 1999).

O consumo anual de queijos no Brasil é de 2,3 kg per capita. Esse valor vem crescendo, mas ainda é pequeno, quando comparado ao da Argentina ou de países europeus. O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro de queijos, com produção em torno de 200 toneladas ao ano, respondendo pela metade do consumo nacional (PERRY, 2004; MEZZADRI, 2005),

O queijo minas frescal vem crescendo dentro da indústria de laticínio, visto que a produção desse queijo proporciona as indústrias um alto rendimento na sua produção (6,0 a 7,0 Litros/Kg), além disso, obtém-se um processamento simples, não precisando de investimentos para a sua maturação e armazenamento possibilitando um custo menor na produção do produto (LOURENÇO NETO, 1998).

Tradicionalmente, o queijo Minas é produzido com a adição de uma cultura láctica *starter* mesofílica tipo O, composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Atualmente os laticínios tendem a substituir parcialmente ou integralmente a adição desta cultura pela acidificação direta de ácido láctico entretanto, essa prática não é microbiologicamente segura, uma vez que apenas a adição de culturas lácticas assegura uma permanente produção de ácido láctico e, conseqüente valores baixos de pH do produto durante seu armazenamento, bem como a produção de outros compostos antimicrobianos. A adição de ácido láctico resulta na diminuição do pH, a qual se restringe ao processamento (SOUZA, 2006).

Desenvolver produtos lácteos com bactérias probióticas é um processo importante para setor industrial, sendo um grande desafio manter cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células, para que possa considerá-lo um alimento probiótico viáveis durante a sua vida de prateleira (KOURKOUTAS *et al*, 2005).

Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas desenvolvem boa multiplicação no leite, promovendo propriedades sensoriais adequadas ao produto e estáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (BURITI; SAAD, 2007).

Considerando os aspectos abordados, o presente trabalho teve como objetivo verificar o processo competitivo do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, com o probiótico, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* em queijo tipo Minas Frescal nos tempos de zero, sete, 14 e 21 dias de armazenamento a temperatura de 5°C, por meio de análises microbiológicas, utilizando o meio *Baird Parker* (BP) para identificação de colônias de *S. aureus* e *Man Rogosa and Sharpe* (MRS) para a identificação dos *Lactobacillus*.

## 2 METODOLOGIA

Os queijos tipo Minas Frescal foram produzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da UNIPAR, a partir de 15 litros de leite integral, pasteurizado e comercial.

Foram produzidos quatro queijos, sendo um queijo padrão (controle) [T<sub>1</sub>]; um queijo com adição de probiótico (*Lactobacillus casei* ssp *casei*) [T<sub>2</sub>]; outro com adição de probiótico (*Lactobacillus casei* ssp *casei*) mais *Staphylococcus aureus* [T<sub>3</sub>] e outro somente com a adição de *Staphylococcus aureus* [T<sub>4</sub>]. Todos os queijos foram fabricados em triplicata. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Mestrado em Ciência Animal da UNIPAR, no tempo zero, sete, 14 e 21 dias de armazenamento.

### 2.1 FABRICAÇÃO DO QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL PADRÃO – (T<sub>1</sub>)

Em 15L de leite pasteurizado comercial e integral e aquecidos a 36°C foram adicionados 4,0 mL de ácido láctico a 85% diluído em 25 mL de água destilada estéril, posteriormente foi adicionado o coalho de acordo com as especificações do fabricante e cloreto de cálcio na forma de solução aquosa a 50% (p/v), na proporção de 2g/10L de leite.

O leite foi deixado em repouso por aproximadamente 50 minutos, e após a coagulação da massa, foi cortada em cubos de aproximadamente 1,0cm, seguida de descanso por mais cinco minutos, realizando então uma agitação lenta por 30 minutos. Posteriormente realizou-se uma dessoragem e adição de aproximadamente 2,0% de sal sobre a massa de queijo. Após esses procedimentos a massa foi colocada em formas de queijo Minas padrão de 0,5 kg realizando três viragens dos queijos em 30, 60 e 90 minutos.

Após as primeiras 24 horas os queijos foram embalados em sacos plásticos não estéril e mantidos a uma temperatura de 5°C até a realização das análises microbiológicas no dia zero, sete, 14, 21.

### 2.2 FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO (T<sub>2</sub>)

A fabricação dos queijos tipo Minas Frescal adicionada de cultura probiótica à base de *Lactobacillus casei* ssp *casei*, foi realizada seguindo o mesmo procedimento para o queijo padrão (controle). As culturas empregadas foram do tipo DVS (*Direct Vat Set* - para adição direta no leite

durante processamento) na forma liofilizada e empregadas de acordo com a recomendação do fabricante (Chr Hansen<sup>R</sup>).

### 2.3. CONTAMINAÇÃO DOS QUEIJOS COM CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E PROBIOTICO (T<sub>3</sub>)

Para contaminação dos queijos tipo Minas Frescal foram utilizadas cepas ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*, provenientes no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Mestrado em Ciência Animal da UNIPAR, que ficavam armazenadas a temperatura de -20°C em meio de *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de glicerol e cultura probiótica à base de *Lactobacillus casei ssp casei*,

### 2.4 CONTAMINAÇÃO DOS QUEIJOS COM CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (T<sub>4</sub>)

Para contaminação dos queijos tipo Minas Frescal foram utilizadas cepas ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*, provenientes no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Mestrado em Ciência Animal da UNIPAR, que estavam armazenadas a temperatura de -20°C em meio de BHI acrescido de glicerol.

Vinte e quatro horas antes da fabricação dos queijos contaminados, foi realizado o repique da amostra padrão em meio BHI ágar e posteriormente, preparada uma suspensão em BHI caldo na concentração de 10<sup>7</sup>UFC/g, ajustada de acordo com a escala de *Mac Farland*, a qual foi adicionada ao leite no momento da fabricação dos queijos, observando que o queijo contaminado foi fabricado nos mesmo padrão do queijo com probiótico.

### 2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para o acompanhamento microbiológico dos queijos foram analisados *Staphylococcus aureus* de acordo com a Instrução Normativa 68 do Ministério da Agricultura de 23 de agosto de 2003 utilizando o meio Agar *Baird Parker* (BP) em placas, onde adicionava-se 0,1 µL na superfície do meio e espalhado com uma alça de Drigalski e incubado ao uma temperatura de 36°C (BRASIL, 2003).

As contagens dos probióticos para o *Lactobacillus casei ssp casei* foram realizadas em meio *Man Rogosa and Sharpe* (MRS), onde colocava 1000 µL da amostra em placa estéril, espalhava-se a amostra e em seguida adicionava-se o meio que envolvesse a superfície da placa, e após a

solidificação do meio era colocada mais uma camada de meio, sendo assim, o procedimento era realizado em múltiplas camadas deixando o ambiente anaeróbio.

As avaliações microbiológicas foram realizadas em triplicata e de acordo com tempo de armazenamentos das amostras analisadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Mestrado em Ciência Animal da Unipar.

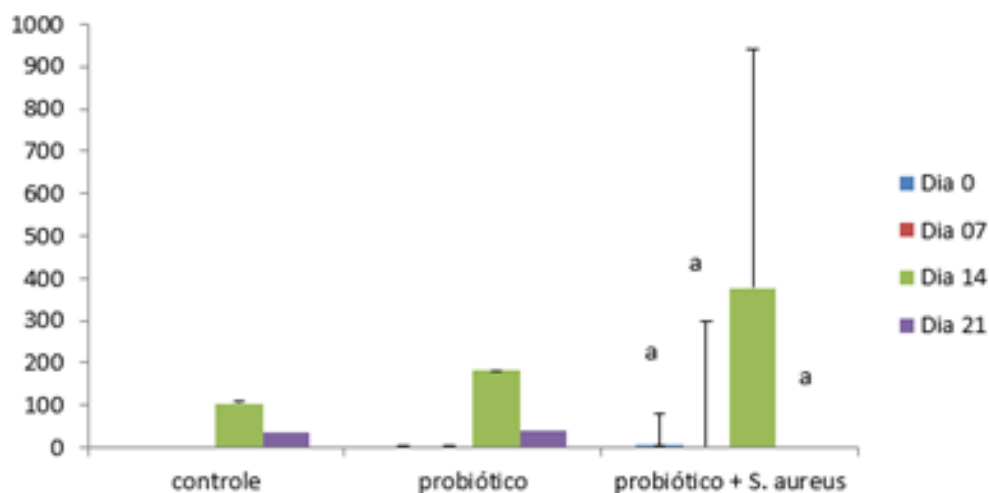
## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises microbiológicas foram realizadas por meio da análise de variância e quando houvesse significância ( $p < 0,05$ ) empregava-se o teste de *Tukey* para comparação de médias, utilizando o programa Biostat 5.0 (AYRES et al, 2007).

## 3 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A figura 01 apresenta o crescimento do *Lactobacillus casei* sp. *casei* nos diferentes queijos e nos diferentes períodos analisados. Pode-se observar que o maior crescimento de *Lactobacillus* foi aos 14 dias no tratamento do queijo probiótico com adição de *S. aureus*, demonstrando no presente estudo que não houve a manutenção deste micro-organismos, discordando de Ribeiro *et al* (2009) que relataram que outras espécies de *Lactobacillus* permanecem viáveis por até 28 dias após a fabricação.

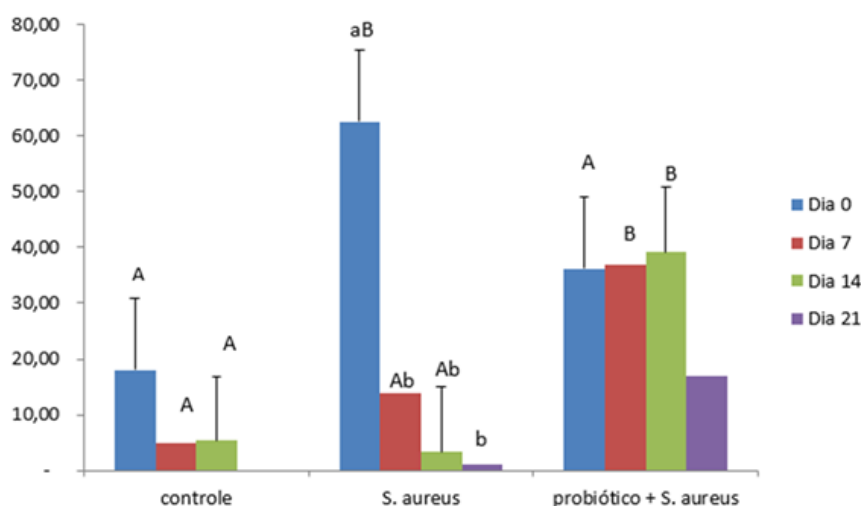
Figura 1 – Crescimento (UFC x  $10^7$ /g) de micro-organismos probiótico nos queijos tipo Minas Frescal produzidos de forma convencional, adicionados de probióticos ou probióticos contaminados com *S. aureus*, nos dias zero, sete, 14 e 21 dias após a fabricação. Umuarama. 2012. Letras minúsculas diferentes demonstram diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes períodos analisados. Teste *Tukey* ( $q = 4,753$ ;  $p < 0,05$ )



Fonte: Dados da pesquisa.

O presente trabalho demonstrou ainda que não houve uma diminuição da contagem de *S. aureus* no tratamento com adição de probiótico *Lactobacillus casei* spp. *casei*. (Figura 2), durante o período de 21 dias de armazenamento. Por outro lado Alves, (2010) verificou que queijos tipo Minas Frescal produzidos por adição de ácido láctico e adição de micro-organismos probióticos como *Lactobacillus acidophilus* diminuíram a presença de *E. coli* mas não as eliminou.

Figura 02. Crescimento (UFC x 10<sup>4</sup>/g) de *Staphylococcus aureus* nos queijos tipo Minas Frescal produzidos de forma convencional, adicionados de probiótico ou probiótico contaminados com *S. aureus*, nos dias zero, sete, 14 e 21 dias após a fabricação. Umuarama. 2012. Letras minúsculas diferentes demonstram diferenças estatísticas significantes (p<0,05) entre os diferentes períodos analisados. Letras maiúsculas diferentes demonstram a diferença estatística entre os grupos no mesmo período. Teste Tukey (q= 4,753; p<0,05).



Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação ao perfil de crescimento de *Staphylococcus aureus* nos diferentes períodos e tratamentos, observou-se uma diminuição do crescimento do *Staphylococcus aureus* entretanto, quando houve acréscimo de probióticos estes números permanecem altos, o que difere do proposto por Costa *et al* (2012).

De acordo com a Figura 02 observa-se as análises realizadas nos tempos zero, sete, 14 e 21 dias de armazenamentos do queijo controle, onde obteve-se uma contaminação inicial por *S. aureus*, no tempo zero de armazenamento desse queijo, podendo essa alta no crescimento do micro-organismos patogênico ser proveniente do leite comercial, no entanto essa contaminação por *S. aureus* diminui ao longo do período de armazenamento do produto, o que pode estar associado ao processo de acidificação do mesmo, já que a temperatura manteve-se constante a 5 °C.

O queijo com adição do *S. aureus* obteve uma média superior de (UFC/g) no tempo zero de maturação, observando-se uma diferença significativa (p<0,05) comparado aos tempos de sete, 14 e

21 de armazenamento do mesmo queijo. Esse aumento está relacionado com adição do micro-organismo patogênico para a produção do queijo contaminado.

Os queijos que foram produzidos e adicionados de micro *S. aureus* e *L. casei ssp casei* tiveram resultados diferentes, onde o micro-organismos probióticos não diminuíram a contaminação dos micro-organismos patogênicos, mas os micro-organismos patogênicos acompanharam a evolução do micro-organismo probiótico. E quando comparamos o tempo zero do queijo com adição somente de *S. aureus* e o queijo com a adição de *S. aureus* e mais *L. casei ssp casei*, onde a quantidade adicionada de micro-organismos contaminantes para a produção desses queijos foram iguais, observa-se no entanto que no queijo com o probiótico teve uma menor multiplicação do *S. aureus*, concluindo que o probiótico contribuiu no controle da multiplicação do patógeno.

Por meio dos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, onde não se obteve uma diminuição significativa através da competição do *S. aureus* com o *L. casei ssp. casei* na produção de queijo tipo Minas Frescal são justificadas, pelo pesquisador onde demonstram que o micro-organismo *L. acidophilus* é relatado como o probiótico mais indicado no processo de competição com patógenos, quando comparado a outras espécies de *Lactobacillus* spp. por possuir capacidade de aderir ao epitélio intestinal, e também, por tolerar a acidez do suco gástrico (GARCIA et al, 2006).

Jay, (1994) também relatou que entre as espécies de *Lactobacillus* spp. mais utilizadas estão os *L. acidophilus*, pois esse micro-organismo está nos subgêneros *Thermobacterium* onde produzem até 3,0% de ácido lático a uma temperatura ótima de crescimento de 40°C, quando comparado com o *L. casei* que está no subgênero *Streptobacterium* como temperatura ótima de crescimento de 30°C e produzem até 1,5% de ácido lático.

Outro ponto a ser discutido é o uso do ácido lático de forma direta no processo de fabricação, o qual contribui na diminuição da contaminação de micro-organismos patógenos. A acidificação de forma adequada dos queijos pode proporcionar uma melhora na preservação e nas características do produto, isso se dá pela diminuição nas alterações causadas nas propriedades de qualidade ao longo do tempo de estocagem (FOX, 2000).

Queijos produzidos com culturas *startes* ou fermentos lácticos mesofílico e até mesmo com micro-organismos probióticos ajudam na obtenção de queijos com características e composição semelhantes aos produzidos com ácido lático, mas a adição de fermento láctico proporciona queijos com uma menor tendência a obterem micro-organismos contaminantes em relação ao uso de ácido lático (LOURENÇO NETO, 1998).

Segundo estudos realizados por Campos e Viotto (1999) comparando o rendimento de queijos Minas Frescal produzidos com adição de fermentos lácticos e os produzidos com ácido lático, observa que os produzidos com ácido lático proporcionam um maior rendimento as empresas, devido a uma



menor acidificação dos queijos e conseqüentemente uma maior concentração de unidade nos mesmo. Observando também que o uso de ácido láctico nos queijos possibilita uma menor proteção contra micro-organismos contaminantes quando comparado com os fermentos lácticos.

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano por meio 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 aumento dos níveis de macrófagos (SAAD, 2006). Esse conjunto de mecanismos resulta em um aumento da resistência contra patógenos, garantindo, assim, a presença de micro-organismos de atividade benéfica à saúde e impedindo a manifestação dos chamados patógenos (NICOLI *et al*, 2003). Assim sendo, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Essa resistência aumentada contra patógenos é a característica mais promissora no desenvolvimento de produtos probióticos eficazes (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al*, 2002).

Os queijos, em geral, apresentam algumas vantagens em relação a outros produtos probióticos. A maioria possui pH mais elevado que iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas por um período mais longo. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem uma proteção para a bactéria probiótica durante sua passagem pelo trato gastrintestinal (GARDINER *et al*, 1999).

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, novos trabalhos devem ser desenvolvidos na tentativa de elucidar quais os metabólitos provenientes pelos probióticos e pelos micro-organismos contaminantes estão contribuindo para diminuir a viabilidade do *Lactobacillus* e o aumento na multiplicação dos *S. aureus*.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Observou-se com o presente estudo que o *Lactobacillus casei ssp. casei* não diminuiu o crescimento de *S. aureus* no Queijo Minas Frescal acidificado de forma direta no processo de produção, não demonstrando assim viabilidade no que refere-se a utilização desse probiótico no controle de micro-organismos contaminantes e no decorrer do seu processo de armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- AYRES, M. *et al* BioEstat 5.0 **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007.
- ALVES, C. C. C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo Minas Frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico**. Niteroi, 2010, 81p. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) Universidade Federal Fluminense.
- BERGAMINI, C. V. *et al* Probiotic bacteria as adjunct starter: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v. 38, p. 597-604, 2005.
- BRANDÃO R. *et al* Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**. n. 64, p. 564-568, 1998.
- BRASIL. Instrução normativa nº.68 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da república Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 18 set. 2003.
- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.
- CAMPOS, A. C.; VIOTTO, W. H. Rendimento do queijo Minas Frescal Fabricado com ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, Juiz de Fora. Anais, v.54 n. 309, 1999.
- COSTA, G. N. *et al*, Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a micro-organismos patogênicos “*in vitro*”, **Semina: Ciências Agrárias**. v. 33, n.5, p.1839-1846, 2012.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 733-739, 2002.
- FOX, P. F. *et al* **Fundamentals of Cheeses Science**. Maryland: Ed. Aspen Publication, 2000. 587 p.
- GARCIA, G. R. *et al* Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, n 101, 2006.
- GARDINER, G. *et al* Evaluation of cheddar cheese as food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999.
- JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zagarosa: Ed. Acribia, 1994. 804p.

LAJOLO, F. M. Alimentos funcionais: legislação brasileira. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE ALIMENTOS FUNCIONAIS, 1, São Paulo, 1999. Anais. São Paulo: ILSI, 1999. CD-ROM.

LOURENÇO NETO, J. P. M. **Uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal com alternativas de melhoria de qualidade.** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL QUEIJO FRESCO, 1. São Paulo. P. 59-75, 1998.

KOURKOUTAS Y. *et al* *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 40, n.1, p. 411-416, 2005.

MEZZADRI, F. P. **Panorama da pecuária leiteira: aspectos internacionais, nacionais e estaduais.** Curitiba: 2005. Disponível em: <  
[http://www.ripasul.com.br/wiki/images/0/00/Atualizacao\\_Perfil\\_da\\_Pecuaria\\_Leiteira\\_Paranaense.pdf](http://www.ripasul.com.br/wiki/images/0/00/Atualizacao_Perfil_da_Pecuaria_Leiteira_Paranaense.pdf)>. Acesso em: 15/03/2013.

MICHIDA, H. *et al* 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.

NICOLI, J.R. *et al* Probióticos: experiências com animais gnobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. Viçosa: Universidade federal de Viçosa, 2003. p. 123-133.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista Química Nova**, v.27, n.2. p.293-300, 2004.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO, Campinas, 2002. p.133-145. [Alimentos funcionais e Biotecnologia].

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. *et al* Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food science & Technology**. v.13, p. 3-11, 2002.

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

SAARELA, M. *et al* Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 99-117, 2002.

SAARELA, M. *et al* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p. 319-331, 2000.

SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SOUZA, C. H. B. **Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de um queijo minas frescal probiótico.** São Paulo,

2006. 110p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

VANDENBERH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiology Reviews**, 12. 1993. p.221–238.