

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

IVONE DA SILVA LIMA

DESENVOLVIMENTO DE UM REQUEIJÃO PROBIÓTICO

Vitória de Santo Antão

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

IVONE DA SILVA LIMA

DESENVOLVIMENTO DE UM REQUEIJÃO PROBIÓTICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, sob orientação da Professora Dra Christine Lamenha Luna Finkler.

Vitória de Santo Antão

2018

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

L732d Lima, Ivone da Silva.
Desenvolvimento de um requeijão probiótico/ Ivone da Silva Lima. - Vitória de Santo Antão, 2018.
39 folhas.; Il.: color.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler.
TCC (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Nutrição, 2018.

1. Tecnologia de Alimentos - Requeijão. 2. Queijo - variedades. I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Título.

641.37352 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-138/2018**

IVONE DA SILVA LIMA

DESENVOLVIMENTO DE UM REQUEIJÃO PROBIÓTICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em: 24/07/2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Finkler (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Nutricionista Roselita Floriano Patú e Silva Andrade (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Nutricionista Aralí da Costa Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Rubenita e Antonio, que foram meu porto seguro perante as dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, que é o centro e fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Rubenita e Antonio pelo incentivo, compreensão e valores transmitidos.

Aos meus irmãos, em especial José Carlos, pelo apoio e motivação.

A meu namorado, José Adelson, por estar ao meu lado em todos os momentos, dando força, tranquilidade, bom ânimo e torcendo por minhas conquistas.

Aos meus familiares, em especial à minha avó Creuza (*in memoriam*), por seu incentivo e ensinamentos.

À minha madrinha, Maria Severina pelo apoio, orações e palavras de conforto.

Aos meus amigos, pela motivação e força.

A minha orientadora Profa. Dra Christine Lamenha Luna Finkler. A senhora, todo o meu respeito, admiração pelo seu profissionalismo acadêmico, e gratidão por cada momento de desenvolvimento e aprendizagem.

Ao técnico do laboratório de bioprocessos e tecnologia de alimentos, Gabriel Locatelli, por todo conhecimento, paciência, incentivo, e contribuição ao longo de todos os experimentos.

Ao técnico do laboratório de bromatologia, Silvio Ferreira, por todo conhecimento, boa vontade e disposição em ajudar ao longo de todas as análises físico-químicas. A Dra Liany Melo, por todo conhecimento, paciência e apoio.

A todos os professores, pelos conhecimentos transmitidos que foram essenciais para a minha formação profissional.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho” (Abraham Lincoln)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFC- Unidade formadora de Colônia

NaCl- Cloreto de sódio

µL- Microlitros

MRS- Man, rogosa e sharpe

PDA- Potato dextrose ágar

BOD- Demanda bioquímica de oxigênio

TGI- Trato gastrointestinal

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Requisitos físico-químicos dos tipos de requeijão de acordo com a legislação.....	16
Quadro 2. Requisitos microbiológicos para o requeijão de acordo com a legislação.....	16
Quadro 3. Descrição da cepa probiótica <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de células viáveis de <i>Lactbacillus rhamnosus</i> na suspensão inicial utilizada para inocular o requeijão e no produto conservado sob refrigeração a 10 °C durante 20 dias de armazenamento	26
Tabela 2. Composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico	26
Tabela 3. Composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico em base seca	27

RESUMO

Existem diversos derivados lácteos e dentre eles está o requeijão cremoso, que é um tipo de queijo fundido, muito consumido em nosso país, sendo fabricado em todo o território nacional. Para ser uma opção de alimento mais saudável e apresentar características funcionais podem ser adicionadas no requeijão bactérias probióticas. Os probióticos são microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, oferecem vários benefícios à saúde do consumidor. Os probióticos fazem parte do grupo dos alimentos funcionais, já que além de suas qualidades nutricionais, beneficiam com uma ou mais funções no organismo. Este trabalho tem como objetivo desenvolver um requeijão probiótico e avaliar as suas características físico-químicas e microbiológicas. Foram preparados dois lotes de requeijão cremoso, um sendo o controle e ao outro foi adicionado a cepa *Lactobacillus rhamnosus*. Os produtos foram submetidos à análise físico-química (lipídeos, proteínas, cinzas, umidade e carboidratos) e microbiológica (contagem de probióticos viáveis durante 20 dias de armazenamento e pesquisa de possíveis contaminantes pela determinação de coliformes totais e termotolerantes e contagem de fungos filamentosos e leveduras). Os resultados indicaram que a composição centesimal de ambas as amostras foram semelhantes, mostrando que a adição do probiótico não alterou a composição do requeijão cremoso. O teor de lipídeos das duas amostras está dentro dos valores recomendados pela legislação, enquanto que a umidade apresentou valores acima do estabelecido para este produto. A cepa *Lactobacillus rhamnosus* permaneceu em quantidades adequadas durante os 20 dias de armazenamento, estando dentro dos padrões recomendados para produtos probióticos. O resultado da análise microbiológica revelou que ambos atendem à legislação vigente, demonstrando boas condições higiênico-sanitárias. Sendo assim, o requeijão é um produto adequado para a adição e desenvolvimento de probióticos, caracterizando o requeijão desenvolvido neste trabalho como um alimento probiótico.

Palavras-chave: Requeijão cremoso. Probiótico. *Lactobacillus*.

ABSTRACT

There are several dairy derivatives and among them is the cream cheese which is a type of cheese fused, very consumed in our country, being manufactured throughout the national territory. To be a healthier food option and to present functional characteristics can be added in the curd probiotic bacteria. Probiotics are living microorganisms, which when ingested in adequate amounts offer several health benefits to the consumer. Probiotics are part of the functional foods group, since in addition to their nutritional qualities, they benefit from one or more functions in the body. This work aims to develop a probiotic cream cheese and evaluate its physicochemical and microbiological characteristics. Two batches of cream cheese were prepared, one being the control and the other was added to the *Lactobacillus rhamnosus*. It was determined the lipid content, protein content, fixed mineral residue (ash), moisture and carbohydrates. A microbiological analysis was performed to for counting total coliforms and termotolerant coliforms, counting of filamentous fungi and yeasts, as well as the counting of viable probiotics during the 20 days of storage. In the physical-chemical analysis the two samples presented similar results, showing that the addition of the probiotic did not alter the composition of the cream cheese. The fat in the dry extract of the two samples is within the values recommended by the legislation, only the humidity presented values above that established for this product. *Lactobacillus rhamnosus* strain was kept in adequate amounts during the 20 days of storage. The results of the microbiological analysis revealed that both comply with current legislation, demonstrating good hygienic-sanitary conditions. Therefore, cream cheese is a suitable product for the addition and development of probiotics, characterizing the curd cheese developed in this work as a probiotic food.

Keywords: Cream cheese. Probiotics. *Lactobacillus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3 JUSTIFICATIVA.....	15
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4.1 Requeijão.....	16
4.2 Probióticos.....	17
4.3 Adição de probióticos em alimentos.....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Microrganismo.....	21
5.2 Condições de cultivo.....	21
5.3 Preparo do requeijão cremoso.....	21
5.3.1 Descrição do processamento do requeijão probiótico.....	23
5.3.2 Avaliação de rendimento do produto.....	23
5.4 Caracterização microbiológica.....	24
5.4.1 Contagem de microrganismos probióticos viáveis.....	24
5.4.2 Contagem de coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C.....	24
5.4.3 Contagem de Fungos filamentosos e Leveduras.....	25
5.5 Caracterização físico-química.....	25
6 RESULTADOS.....	26
7 DISCUSSÃO.....	28
8 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO A- Tabela de NPM.....	33
APÊNDICE A - Preparo do requeijão.....	34
APÊNDICE B – Algumas imagens da análise microbiológica –.....	36
Contagem de células viáveis.....	36
APÊNDICE C- Algumas imagens da análise microbiológica – contagens de coliformes.....	37
a 35° C e 45 °C e análise de fungos filamentosos e leveduras.....	37
APÊNDICE D- Algumas imagens da Caracterização físico-química e do rendimento do requeijão.....	39

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são um grupo de alimentos que possuem em sua composição proteínas de alto valor biológico e nutrientes essenciais como cálcio, fósforo, vitaminas A, D, B2, biotina e outros componentes. (PHILIPPI, 2014). Existem inúmeros derivados lácteos e dentre eles está o requeijão cremoso, que é um tipo de queijo fundido, muito consumido em nosso país, sendo fabricado em todo o território nacional mas com variações de tecnologia e características (SILVA et al., 2012).

De acordo com BRASIL (1997, p.1), "Requeijão cremoso é aquele obtido por fusão de uma massa coalhada dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butteroil". Para ser uma opção de alimento mais saudável e apresentar características funcionais podem ser adicionadas ao requeijão bactérias probióticas. Os probióticos são microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidades adequadas, oferecem vários benefícios à saúde do consumidor. (FAO, 2006).

"A demanda por alimentos que promovem saúde e bem-estar vem aumentando. Entre os alimentos que atendam a essa demanda, aqueles com propriedades funcionais têm atraído a atenção dos consumidores e da indústria alimentar" (CABRAL, 2014 p.13).

No mercado consumidor já existem outros alimentos com a adição dessas bactérias probióticas, a exemplo dos leites fermentados e iogurtes (STANTON et al., 1998 apud GAINO, 2012). Segundo Gaino (2012), estes alimentos são altamente consumidos porque a população já tem noção dos inúmeros benefícios que estes trazem para a saúde.

No intestino humano os probióticos impedem que microrganismos patogênicos se proliferem, restauram a permeabilidade intestinal e agem como imunomoduladores (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). Para serem obtidos os benefícios desejados, a quantidade mínima viável de probióticos deve estar dentro da faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do produto pronto para consumo, de acordo com a recomendação diária estabelecida pelo fabricante (BRASIL, 2018).

Para uma cultura probiótica ser utilizada em alimentos primeiramente ela deve ser aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008), e atualmente as cepas mais usadas são do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, a saber: *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei var rhammnosus*, *L. casei var defensis*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, incluindo a subespécie *B. lactis*, *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Essas bactérias produzem alguns metabólitos que irão agir como inibidores do crescimento de bactérias, principalmente as patogênicas (KURITZA; WESTPHAL; SANTIN, 2014). Para serem utilizadas, essas bactérias precisam ser consideradas seguras, não carcinogênicas, não patogênicas e serem capazes de se agregar as outras bactérias, formando uma microbiota balanceada (SALMINEN et al., 1996 apud KURITZA; WESTPHAL; SANTIN, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um requeijão probiótico e avaliar as suas características físico- químicas e microbiológicas.

2.2 Específicos

- Preparar duas amostras de requeijão cremoso;

- Avaliar a viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, em uma das amostras de requeijão durante 20 dias de armazenamento.

- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas das amostras.

3 JUSTIFICATIVA

O requeijão caseiro é um alimento mais saudável quando comparado à versão industrializada. Para agregar valor ao produto, melhorar sua qualidade e apresentar propriedades funcionais pode ser adicionado em sua composição bactérias probióticas. Constituindo o produto como uma nova opção de derivado lácteo probiótico que quando consumido diariamente fornecerá diversos benefícios à saúde.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Requeijão

Estudos relatam que o requeijão teve seu surgimento na época em que o derivado do leite mais valorizado era a manteiga. Nessa época o requeijão era fabricado a partir de leite desnatado e através do aproveitamento do leite que coagulava devido à ação da microbiota láctica natural do leite (MUNCK; CAMPOS, 1984, OLIVEIRA, 1986 *apud* ALVES, 2004).

Nesse tempo, as fabricas artesanais tinham desnatadeiras que separavam o creme, e o leite desnatado resultante era deixado coagular de forma natural para assim ser obtida a massa que posteriormente seria transformada em requeijão (MUNCK; CAMPOS, 1984; OLIVEIRA, 1986 *apud* ALVES, 2004). Hoje, a indústria de alimentos faz a obtenção do requeijão através da coagulação ácida e/ou enzimática do leite (BRASIL, 1997).

De acordo com o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de requeijão (Portaria nº 359, de 04/09/ 1997, p.24), a denominação de requeijão é destinada ao produto no qual a "base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea". Ele ainda é classificado de acordo com as matérias-primas utilizadas em sua formulação, teor de gordura no extrato seco e teor de umidade em: requeijão cremoso e requeijão de manteiga. O Quadro 1 mostra os requisitos físico-químicos dos tipos de requeijão de acordo com a legislação.

Quadro 1: Requisitos físico-químicos dos tipos de requeijão de acordo com a legislação

Requisito	Requeijão	Requeijão cremoso	Requeijão manteiga
Matéria gorda no extrato seco	45,0 a 54,9	Min. 55	25,0 a 59,9
Umidade g/100g	Max. 60	Max. 65	Max. 58

Fonte: BRASIL, 1997

Quadro 2 : Critérios microbiológicos para o requeijão de acordo com a legislação

Microrganismo	Critério
Coliformes/g 35°C	n = 5 c = 2 m = 10 M = 100
Coliformes/g 45°C	n = 5 c = 2 m < 3 M = 10

Em nosso país, o requeijão cremoso é o produto mais tradicional e consumido pela população. Em sua composição podem ser adicionados condimentos e especiarias e/ou outras substâncias alimentícias desde que venha descrito na embalagem do produto. O requeijão deve apresentar “cor e odor característicos, consistência untável, textura cremosa, fina e lisa e sabor de creme levemente ácido e opcionalmente salgado” (BRASIL, 1997 p.1; BRASIL, 2006 p. 12).

4.2 Probióticos

Probiótico é uma palavra derivada do grego e significa “para a vida”. O interesse por microrganismos que de alguma forma trazem benefícios à saúde é bem antigo (SCHREZENMEIR J, VRESE M., 2001 *apud* RAIZEL 2011). Lilly e Stillwell, em 1965, foram os primeiros a utilizarem esse termo para designar substâncias secretadas por um protozoário que favoreciam o crescimento de outros (COPPOLA; TURNES, 2004).

A partir daí os probióticos receberam diversas definições, sendo a mais aceita a de que são microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas, oferecem vários benefícios à saúde do consumidor. (FAO, 2006).

Os probióticos fazem parte do grupo de alimentos funcionais, já que além de suas qualidades nutricionais, beneficiam com uma ou mais funções no organismo (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009).

Dois gêneros são utilizados como bactérias probióticas, isto por que são habitantes predominantes do intestino humano, sendo estes os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O gênero *Bifidobacterium* é encontrado no intestino grosso e se caracteriza por serem anaeróbios estritos e Gram-positivos (PASCHOAL et al., 2008 *apud* MONTEIRO, 2012). Já os *Lactobacillus* estão presentes no intestino delgado e possuem as características de serem bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas, não formadores de esporos (MARTINS et al., 2005 *apud* MONTEIRO, 2012).

Dentre as cepas que participam desse gênero temos *L. rhamnosus*, que se caracteriza como bastonetes curtos, Gram-positivo, não esporulado, anaeróbio facultativo, crescendo melhor à temperatura de 30°C-40°C (GARRITY et al., 2004 *apud* OLIVEIRA 2016). Está presente em derivados lácteos, especificamente em queijos artesanais, ou produzidos com leite sem tratamento térmico, no trato gastrintestinal e vaginal (SENA, 2000; GUEDES NETO, 2004; DORON et al., 2005; LEÃO et al., 2015 *apud* OLIVEIRA, 2016).

Esta cepa faz parte da microbiota intestinal saudável do homem e apresenta uma maior tolerância às condições do trato gastrointestinal e melhor sobrevivência quando adicionada em alimentos funcionais (GORBACH, 2002; LANDERSJÖ et al., 2002 apud CICHOSKI, 2008).

Estes dois gêneros produzem compostos orgânicos oriundos da atividade fermentativa, como ácido lático, peróxido de hidrogênio e ácido acético, que elevam a acidez intestinal (FOOKS; GIBSON, 2002 apud MORAIS; JACOB, 2006). Produzem substâncias denominadas bacteriocinas, que auxiliam na destruição de microrganismos patogênicos, impedindo seu desenvolvimento e possíveis danos ao epitélio intestinal (FOOKS; GIBSON, 2002 apud MORAIS; JACOB, 2006). “Também são capazes de promover lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrintestinal, contribuindo para a redução da alergenicidade das proteínas e minimizando o risco de alergia alimentar” (MORAIS; JACOB, 2006, p. 193).

O consumo de probióticos fornece os seguintes benefícios: Inibir o crescimento de bactérias patogênicas, aumentar a resistência à infecções, estabilizar a microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promover a digestão adequada, inclusive da lactose; estimular a resposta imunológica; aliviar a constipação e aumentar a absorção de minerais e produção de vitaminas (MORAIS; JACOB, 2006; SHAH; LANKAPUTHRA, 1997 apud GAINO et al., 2012, p. 02).

Kuritz, Westphal e Santin (2014) relatam que esses microrganismos produzem peptídeos antimicrobianos e possuem facilidade de se aderir à mucosa do hospedeiro, impedindo a adesão e desenvolvimento de patógenos. Podem ainda fornecer outros benefícios, como: Digerem os alimentos e concorrem com os patógenos pelos nutrientes; alteram o pH local para criar um ambiente local desfavorável aos patógenos; fagocitam os radicais superóxidos; estimulam a produção epitelial de mucina; aumentam a função da barreira intestinal e modificam as toxinas de origem patogênica (GUARNER et al., 2011).

Os probióticos agem contra as bactérias intestinais aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a quantidade de microrganismos patogênicos. Afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa e os não-imunes através de um antagonismo e concorrência com os micro-organismos patogênicos (GUARNER et al., 2011).

No sistema imune apresentam os seguintes benefícios: Ativam os macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) tanto local quanto sistemicamente; Modulam os perfis das citocinas; Induzem a hipo-resposta aos antígenos alimentares (GUARNER et al., 2011).

Para ser considerado probiótico a bactéria precisa atender aos seguintes critérios: Ser de origem humana, ter resistência ao processamento e estabilidade às secreções ácida e biliar; ter habilidade de aderir às células do hospedeiro; capacidade de influenciar atividade metabólica local; excluir ou reduzir a aderência de bactérias patogênicas; persistir e se multiplicar; produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas; ser seguro; não invasivo; não carcinogênico e não patogênico e possuir a capacidade de se agregar as outras bactérias para formar uma microbiota balanceada (SALMINEN et al. 1996 *apud* KURITZA; WESTPHAL; SANTIN 2014, p.1458; SZAJEWSKA et al. 2006 *apud* MORAIS; JACOB, 2006 p.192).

Uma cepa probiótica é descrita por seu gênero, espécie, e uma identificação alfanumérica. No Quadro 3 temos o exemplo de descrição para *Lactobacillus rhamnosus*.

Quadro 3. Descrição da cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus*

Gênero	Espécie	Designação da cepa
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	ATCC 7469

Fonte: GUARNER et al, 2011, p. 06

No produto o probiótico deve estar especificado por gênero e cepa, as bactérias precisam estar viáveis, ser utilizado em dose adequada até o fim de sua vida útil, apresentar eficácia comprovada e ser inócuo (GUARNER et al., 2011)

Os produtos probióticos devem ser mantidos bem refrigerados. Ao serem ingeridos, vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, sem se fixarem, equilibrando-a e, com isso, auxiliam o trabalho de absorção dos nutrientes (VARALLO, THOMÉ, TESHIMA, 2008). Estudos têm demonstrado que o consumo de probióticos deve ser diário, pois quando o consumo é interrompido eles não colonizam o intestino e desaparecem do TGI (ALANDER et al., 1999 *apud* CABRAL, 2014).

4.3 Adição de probióticos em alimentos

Os probióticos podem ser encontrados em produtos lácteos e alimentos fortificados. Também estão presentes em comprimidos, cápsulas, suplementos dietéticos e sachês contendo bactérias em forma liofilizada (GUARNER et al., 2011).

Além de iogurtes e leite fermentados, os probióticos já foram incorporados em queijos tipo Cheddar, Gouda, Cottage, Crescenza, cremoso, prato e Minas frescal, e tornaram-se produtos bem aceitos pelo consumidor (BURITI, 2005; CICHOSKI et al., 2008; BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008; RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009 *apud* TEIXEIRA, 2012, p. 19). Porém alguns desses queijos possuem um período de maturação longo, impossibilitando assim a viabilidade dos probióticos (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009 *apud* TEIXEIRA, 2012).

Uma vantagem que os queijos apresentam em relação aos iogurtes e leites fermentados favorecer um meio estável para a sobrevivência de culturas probióticas, isto porque apresentam uma grande quantidade de gordura e matriz sólida, fazendo com que haja proteção da bactéria probiótica no período de estocagem e na passagem pelo trato digestivo (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009; GARDINER et al., 1999 *apud* TEIXEIRA, 2012, p. 19).

Hoje, o foco é a incorporação em queijos frescos por que são armazenados sob-refrigeração e por um período de tempo reduzido, sendo estas condições favoráveis para a adição dos probióticos, e essa é a situação que se encontra o requeijão cremoso (HELLER et al., 2003 *apud* BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração e as análises dos produtos foram realizadas nos Laboratórios de Técnica Dietética, Bromatologia, Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos do Centro de Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.1 Microrganismo

Foi empregada a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, adquirida a partir de uma doação do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. O microrganismo estava mantido liofilizado em frascos *eppendorf*.

5.2 Condições de cultivo

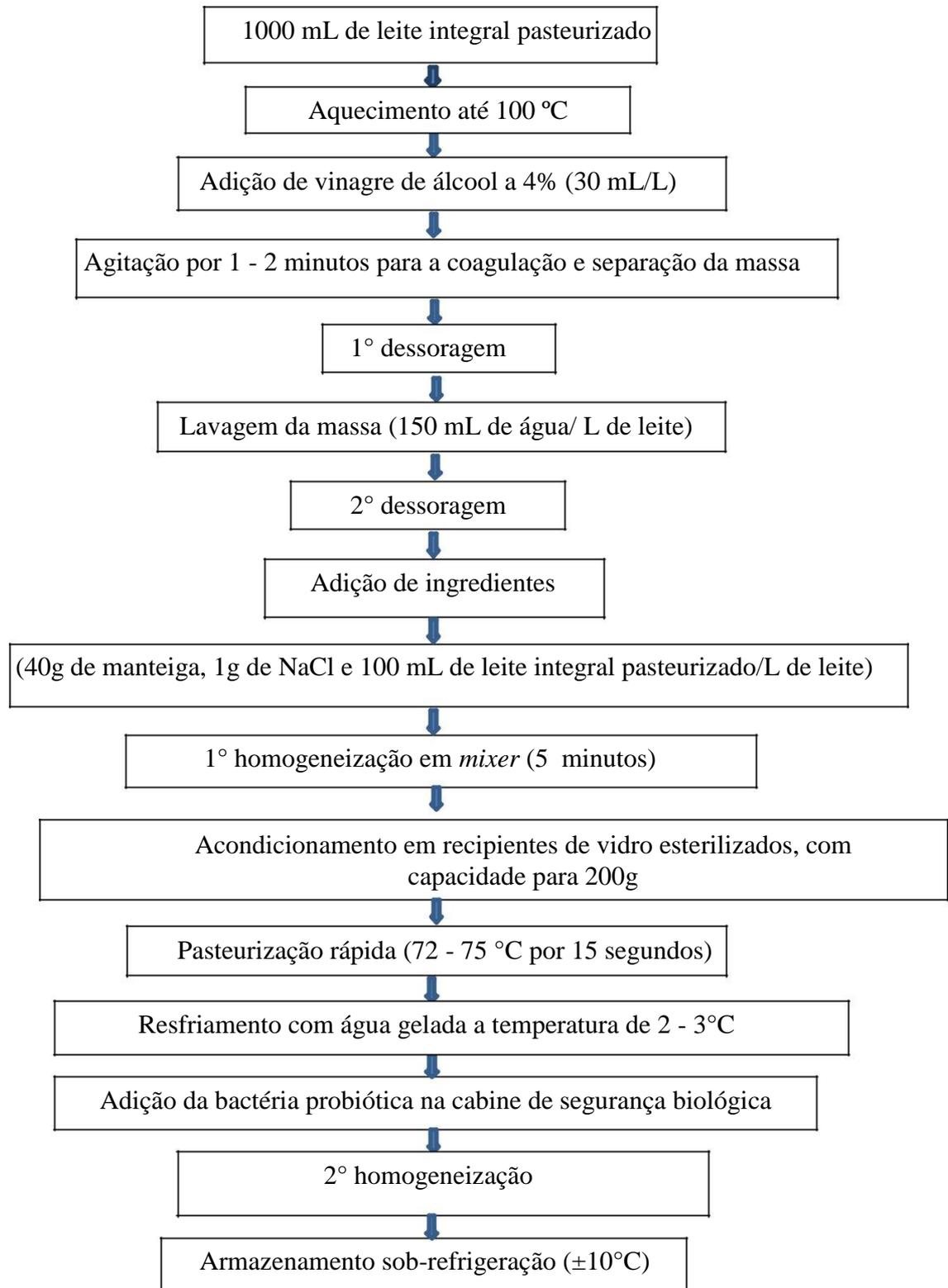
O conteúdo de um tubo *eppendorf* contendo o microrganismo liofilizado foi transferido para um Erlenmeyer contendo meio caldo MRS acrescido de 2 % p/v de glicose, e o cultivo foi realizado em condição estacionária a 37 °C por 48 horas. Após observação turvamento do meio caldo MRS indicando crescimento microbiológico, foi transferido 500 µL para tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85% p/v de NaCl), um volume de 100 µL das amostras foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose pela técnica de semeadura de superfície. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 3-5 dias.

Após a observação do crescimento das colônias em placas de Petri, colônias isoladas foram selecionadas para o preparo de uma suspensão microbiana em 5 mL de leite integral. Esta suspensão foi usada para incorporar os microrganismos probióticos no requeijão.

5.3 Preparo do requeijão cremoso

A Figura 1 mostra o fluxograma para o desenvolvimento do requeijão cremoso. A adição dos microrganismos foi realizada após a etapa de resfriamento. Em seguida, o mesmo foi armazenado sob-refrigeração a 10 °C. Foi preparado um requeijão controle, sem a adição dos microrganismos probióticos.

Fig. 1- Fluxograma de preparação do requeijão cremoso



Fonte: Adaptação de TEIXEIRA, 2012.

5.3.1 Descrição do processamento do requeijão probiótico

Na preparação foram utilizados 1000 mL de leite integral pasteurizado. O mesmo foi aquecido até uma temperatura de 100 °C dentro de uma panela de inox e em fogo baixo. Assim que o leite entrou em ponto de ebulição foi adicionado 30 mL de vinagre de álcool, mexendo-se com o auxílio de uma colher de inox até a completa coagulação e separação da massa.

Posteriormente foi feita a dessoragem colocando-se a massa em uma peneira de metal e pressionando a mesma com o auxílio de uma colher de inox. Depois, foi utilizado um volume de 150 mL de água para lavagem da massa, sendo realizada em seguida a 2ª dessoragem. Posteriormente, foram adicionados à massa os seguintes ingredientes: 40 g de manteiga, 1 g de NaCl e 100 mL de leite integral pasteurizado. Os mesmos foram homogeneizados em *mixer* da marca Britânia com Lâminas em Aço Inox e Copo Medidor - 200W por 5 minutos.

Em seguida, foi acondicionado duas amostras de 100 g cada do produto em recipientes de vidro previamente esterilizados com capacidade de 200g. Em seguida, os frascos foram pasteurizados em uma panela com água e com auxílio de um termômetro de mercúrio foi possível fazer uma pasteurização rápida (72 – 75°C por 15 segundos). Posteriormente, os frascos foram resfriados em água gelada a 2 – 3 °C.

Para o preparo do requeijão probiótico, foi adicionado a um dos frascos 5 mL da suspensão de microrganismos em leite previamente preparada, procedimento este realizado na cabine de segurança microbiológica classe II B 2 modelo: SBIIB2 em condições assépticas. Em seguida foi realizada a 2ª homogeneização com auxílio de uma espátula de silicone. Ambos os produtos foram armazenados sob-refrigeração a ± 10 °C para posterior análise físico-química e microbiológica.

5.3.2 Avaliação de rendimento do produto

O rendimento do produto foi avaliado por meio da pesagem, em massa, do produto obtido, considerando o volume inicial de ingredientes. Desta forma foi utilizado 1000 mL de leite integral adicionado de 40 g de manteiga, 1 g de NaCl, 30 mL de vinagre álcool e 100 mL de leite integral, totalizando 1.171 g.

5.4 Caracterização microbiológica

5.4.1 Contagem de microrganismos probióticos viáveis

Inicialmente, foi preparada uma amostra de requeijão em citrato de sódio a 2% dissolvendo-se 25 g do produto em 225 mL da solução de citrato (diluição 10^{-1}).

A partir de diluições decimais seriadas das amostras (500 μ L da suspensão microbiana em leite e 500 μ L da amostra de requeijão diluída em citrato de sódio) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85% p/v de NaCl), um volume de 100 μ L das amostras foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose pela técnica de semeadura de superfície. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 3-5 dias. Os resultados foram expressos como UFC/mL para a suspensão microbiana e em UFC/g para as amostras de requeijão probiótico.

5.4.2 Contagem de coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C

A contagem de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

1. As embalagens contendo o produto foram higienizadas com água corrente, detergente e álcool etílico 70% para remoção dos contaminantes superficiais;
2. Assepticamente, pesou-se 25 g de cada amostra;
3. As amostras foram transferidas para 225 mL de solução citrato de sódio 2% (diluição 10^{-1}) e em seguida homogeneizadas;
4. Um volume de 10 mL de cada amostra foi transferido para a primeira série de 3 tubos contendo caldo lactosado duplo. Em seguida transferiu-se 1 mL das amostras para a segunda série de 3 tubos contendo caldo lactosado simples. E por fim foi transferido 0,1 mL das amostras para a terceira série de 3 tubos contendo caldo lactosado simples;
5. Os tubos foram incubados em BOD durante 24 h, a 35°C, para observação do crescimento microbiano com produção de gás.
6. De cada tubo positivo, foi transferida uma alçada para tubo contendo caldo verde brilhante (CVB). Em seguida os tubos foram incubados em estufa durante 24/48h h, a 35°C, para observação de possível crescimento microbiano com produção de gás;
7. De cada tubo positivo do CVB, transferiu-se uma alçada para tubo contendo caldo *Escherichia coli* (EC). E por fim os tubos foram incubados em BOD durante 24/48h h,

a 45°C, para observação de possível crescimento microbiano com produção de gás.

O cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e 45°C por grama de requeijão cremoso foi realizado utilizando-se a tabela de conversão para 3 tubos (intervalo de confiança de 95%) de acordo com o descrito por (SILVA et al., 2010).

5.4.3 Contagem de Fungos filamentosos e Leveduras

Inicialmente, foi preparada uma amostra de requeijão em citrato de sódio a 2% dissolvendo-se 25 g do produto em 225 mL da solução de citrato (diluição 10^{-1}).

A partir de diluições decimais seriadas das amostras (500 µL da amostra de requeijão diluída em citrato de sódio) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85% p/v de NaCl), um volume de 100 µL das amostras foi inoculado em placas de Petri contendo meio PDA pela técnica de semeadura de superfície. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias para verificação de possível crescimento de fungos e leveduras.

5.5 Caracterização físico-química

Foram determinados os teores de lipídeos, proteínas, resíduo mineral fixo (cinzas), umidade e carboidratos por diferença. O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, utilizando butirômetro para leite; as proteínas pelo método de *Kjeldahl*, a umidade por meio da evaporação em estufa à temperatura de 105°C por 24 h; cinzas por calcinação em forno mufla a 525 °C por 16 horas e o carboidrato por diferença.

As análises para determinação da composição centesimal dos requeijões foram realizadas em triplicata. Todas as análises foram efetuadas de o descrito por (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

6 RESULTADOS

O rendimento do produto foi 346 g de requeijão a partir de 1000 mL de leite integral.

A Tabela 1 mostra os resultados de concentração de células viáveis de *Lactbacillus rhamnosus* na suspensão inicial utilizada para inocular o requeijão e as concentrações celulares durante 20 dias de armazenamento do produto sob-refrigeração a 10 °C.

Tabela 1. Concentração de células viáveis de *Lactbacillus rhamnosus* na suspensão inicial utilizada para inocular o requeijão e no produto conservado sob- refrigeração a 10 °C durante 20 dias de armazenamento

Suspensão inicial utilizada para inocular o requeijão	Requeijão probiótico		
	1 dia	10 dias	20 dias
$1,24 \times 10^{10}$ UFC/mL	$7,8 \times 10^9$ UFC/g	$2,7 \times 10^{10}$ UFC/g	$5,2 \times 10^{10}$ UFC/g

Fonte: LIMA, I.S., 2018

Foi obtida uma concentração celular de $1,24 \times 10^{10}$ UFC/ mL na amostra usada para inocular no requeijão. Após o 1° dia de armazenamento a contagem no requeijão foi de $7,8 \times 10^9$ UFC/g. No 10° dia de inoculação da cepa, a contagem do requeijão foi de $2,7 \times 10^{10}$ UFC/g e no 20° dia a contagem foi igual a $5,2 \times 10^{10}$ UFC.

Não foi detectada a presença de fungos filamentosos e leveduras nas amostras do requeijão. Constatou-se a presença de bactérias heterotróficas com o valor de 1.100 NMP/g . A presença de coliformes totais foi detectada com um valor de 3,6 NMP/g e coliformes fecais de <3,0 NMP/g.

A Tabela 2 mostra os resultados de composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico, e a Tabela 3 os resultados de composição centesimal em base seca.

A Tabela 2 mostra os resultados de composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico, e a Tabela 3 os resultados de composição centesimal em base seca.

Tabela 2. Composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico.

Amostra	Lipídios (g.100 g ⁻¹)	Proteína (g.100 g ⁻¹)	Carboidrato* (g.100 g ⁻¹)	Umidade (g.100 g ⁻¹)	Cinzas (g.100 g ⁻¹)
Requeijão controle	20,27 ± 1,63	8,78 ± 0,13	0,33	69,10 ± 0,18	1,52 ± 0,08
Requeijão probiótico	19,21 ± 1,63	7,86 ± 0,05	0,21	71,26 ± 0,11	1,46 ± 0,00

*Determinado por diferença
Média ± desvio padrão (n= 3)
Fonte: LIMA, I.S., 2018

Tabela 3. Composição centesimal das amostras de requeijão controle e requeijão probiótico em base seca.

Amostra	Lipídios (g.100 g⁻¹)	Proteína (g.100 g⁻¹)	Carboidrato* (g.100 g⁻¹)	Cinzas (g.100 g⁻¹)
Requeijão controle	65,60	28,41	1,07	4,92
Requeijão probiótico	66,84	27,35	0,73	5,08

*Determinado por diferença
Média ± desvio padrão (n= 3)
Fonte: LIMA, I. S., 2018

7 DISCUSSÃO

A cepa *Lactobacillus rhamnosus* permaneceu viável durante os 20 dias de armazenamento do requeijão a 10 °C. Pelos resultados da Tabela 1, observa-se que houve aumento da concentração celular durante os últimos 10 dias de armazenamento, atingindo no final do período uma concentração de $5,2 \times 10^{10}$ UFC/g. Este resultado caracteriza este requeijão como derivado lácteo probiótico, demonstrando que o produto é adequado para o veículo desse microrganismo.

Resultado diferente foi encontrado por Gaino et al. (2012), que observaram que o requeijão cremoso probiótico com adição de *Lactobacillus casei* apresentou uma contagem inicial $2,2 \times 10^7$ UFC/g. Essa concentração celular permaneceu constante durante o período de 28 dias de armazenamento a 4°C.

Teixeira (2012) preparou um requeijão cremoso com a adição de *L. acidophilus* e *B. bifidum* e verificou que essas cepas mantiveram-se viáveis por 15 dias de armazenamento a temperatura de 10 °C. Porém foi visto que houve redução da quantidade de *L. acidophilus* em dois ciclos logarítmicos, atingindo ao final do período uma concentração celular de $4,0 \times 10^7$ UFC/g, e uma redução de 1 ciclo logarítmico de *B. bifidum* com uma concentração final de $2,0 \times 10^8$ UFC/g.

A Anvisa (2008) estabelece que para o alimento ser considerado probiótico deve apresentar em sua composição a quantidade mínima de células viáveis na faixa de 10^8 a 10^9 UFC. Dessa forma, o requeijão desenvolvido neste trabalho pode ser caracterizado como um alimento probiótico.

O resultado da análise microbiológica mostrou que o produto está dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 1997). Esses resultados demonstraram boas condições higiênico-sanitárias, estando o produto apto para consumo.

Em relação à composição centesimal, os resultados obtidos foram semelhantes para ambos os produtos (controle e requeijão probiótico). Segundo Brasil (1997), o requeijão cremoso deve apresentar um teor mínimo de matéria gorda no extrato seco de 55% e um teor máximo de umidade de 65%. De acordo com o observado na Tabela 3, os dois requeijões estão adequados em relação ao teor de matéria gorda no extrato seco. Este resultado está semelhante ao encontrado por Teixeira (2012), que preparou um requeijão controle com 66,9% de lipídeos e um requeijão probiótico com 61,4% deste componente, não havendo diferença significativa entre esses resultados.

Os resultados da umidade das amostras do requeijão (69,10 % e 71,26% para os produtos controle e probiótico) estão acima do preconizado pela legislação, que é de no máximo 65%. Não foram encontrados na literatura trabalhos que mostrem resultados semelhantes. Este resultado pode ser contornado se for realizado um ajuste de metodologia, modificando-se a quantidade de leite adicionado para finalizar a preparação do requeijão de forma a ser atingida a umidade máxima permitida para este produto.

8 CONCLUSÃO

A composição físico-química das duas amostras de requeijão foram semelhantes, mostrando que não houve alteração com a adição do probiótico. A contagem de *Lactobacillus rhamnosus* se manteve adequada ao longo dos 20 dias de armazenamento refrigerado do produto, atingindo $5,2 \times 10^{10}$ UFC/g após 20 dias de armazenamento, sendo desta forma considerado como requeijão probiótico. De acordo com esses resultados, foi comprovado que o requeijão cremoso é um produto adequado para a adição de microrganismos probiótico.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M. V. **Estabilidade de requeijão cremoso em diferentes embalagens com e sem exposição à luz**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campinas, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón. **Diário oficial da união de 08 de setembro de 1997**. São Paulo, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2467> Acesso em 10. Mai. 2017
- BRASIL. Portal da Anvisa. **Probióticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília – DF.2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true Acesso em: 22 fev.2018.
- BRASIL. Portal de Legislação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006 / MAPA - Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos - Produtos Lácteos**. 2006. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68> Acesso em:26 mai. 2017
- BURITI F. C. A., CARDARELLI, H. R., SAAD, S. M. 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, p. 76 jan./mar., 2008.
- CABRAL, N. S. M. **Kefir Sabor Chocolate: Caracterização Microbiológica e Físico-Química**. 2014, 84 f. Trabalho de conclusão de curso em bacharelado em Nutrição - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ
- CICHOSK, A. J., et al. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28, n.1, p.214-219, jan.-mar. 2008.
- COPPOLA, M. M., TURNES C. G., Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization – FAO/WHO**. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Roma, Itália: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2006. 56 p.
- GAINO.V. O. et al. Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de Lactobacillus casei, da composição físico-química e aceitação sensorial. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina – PR, v. 33, n. 2, p. 3133-3142, dez. 2012.

GUARNER, F. et al. **Probióticos e prebióticos**. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia - Outubro, 2011.

KURITZA, L. N; WESTPHAL; P. SANTIN. E., Probióticos na avicultura. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**, Rio Grande do Sul- RS, v.44, n.8, p.1457-1465, ago, 2014.

MORAIS, M. B. O; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **J. Pediatr.** (Rio J.), Porto Alegre, v. 82, n. 5, nov. 2006.

MONTEIRO, J. F. C. G. **Uso de Probióticos na Prevenção e Tratamento de Doenças Intestinais**. 2012, 35 f. Trabalho de conclusão de curso. (Monografia em Nutrição)- Faculdade de Ciências da Educação e Saúde - Centro Universitário de Brasília– UniCEUB, Brasília, 2012.

NOGUEIRA, J. C. R., GONÇALVES M. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Paraíba. v.15, n. 4, p. 487-492, 2011.

OLIVEIRA, M. C. P.P **Efeito protetor de *Lactobacillus plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (D1) de queijo Minas artesanal na infecção experimental por *Escherichia coli* EHEC e EIEC e o desenvolvimento de leite de búfala fermentado**. Tese (Doutorado em Ciência animal) -Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte – MG, 2016.

PHILIPPI. T. S. **Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos de nutrição**. (Guias de nutrição e alimentação) 2º ed. rev. Barueri, SP: Manole, 2014. p.97

RAIZEL. R et al 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.

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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.29, n.1, p. 19-23, jan.-mar. 2009.

SILVA N., et al., **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: livraria Varela, 2010.

SILVA, R. C. S. N. S. et al. Teor de gordura e de água: fatores determinantes na textura e na aceitabilidade de requeijão light. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.1, p. 119, 2012.

TEIXEIRA, G. L. S. B. **Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum***. 2012. 62 f. Dissertação. (Mestrado em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

VARALLO, M. A.; THOMÉ J. N. ;TESHIMA E., Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun. 2008

ZENEON, O. PASCUET N. S., TIGLEA P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ANEXO A- Tabela de NPM.

Número Mais Provável e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 10, 0,1-0,01 g ou mL.

Combinação de tubos +	NMP/g ou mL	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/ g ou mL	Intervalo do confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: SILVA et al., 2010.

APÊNDICE A - Preparo do requeijão



1. Aquecimento do leite



2. Separação da massa e o soro



3. 1º dessoragem da massa



4. 1º pesagem da massa



5. Lavagem da massa



6. 2º dessoragem da massa



7. Ingredientes: Massa, NaCl, manteiga mais leite integral pasteurizado



8. Homogeneização dos ingredientes no *mixer*



9. Pesagem do requeijão



10. Pasteurização rápida do requeijão



11. Requeijão pronto

**APÊNDICE B – Algumas imagens da análise microbiológica –
Contagem de células viáveis**



1. Pesagem da amostra do requeijão com a cepa *Lactobacillus rhamnosus*



2. Amostra do requeijão na solução citrato de sódio a 2%



3. Jarra de anaerobiose com placas de petri



4. Placa de petri com colônias na diluição 10^7

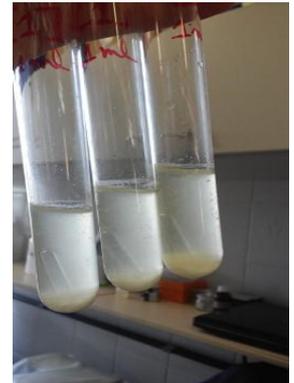
APÊNDICE C- Algumas imagens da análise microbiológica – contagens de coliformes a 35° C e 45 °C e análise de fungos filamentosos e leveduras



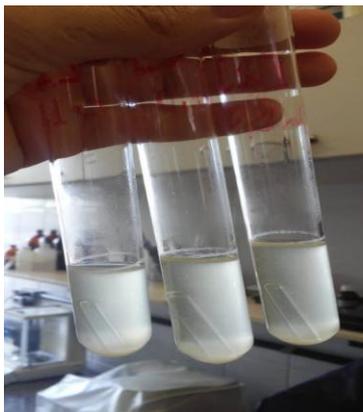
1. Tubos de ensaio com meio lactosado duplo contendo 10 mL da amostra, e tubos de ensaio com meio lactosado simples contendo 0,1 mL e 0,01 mL de amostra.



2. Resultado dos tubos de ensaio com meio lactosado duplo contendo 10 mL da amostra.



3. Resultado dos tubos de ensaio com meio lactosado simples contendo 0,1 mL da amostra



4. Resultado dos tubos de ensaio com meio lactosado simples contendo 0,01 da amostra



5. Tubos de ensaio com caldo verde brilhante contendo uma alçada das amostras dos tubos de ensaio positivo da etapa anterior



6. Tubos de ensaio com caldo verde brilhante com resultado positivo para coliformes totais



7. Tubo de ensaio com caldo EC com alçada da amostra positiva para coliformes totais



8. Tubo de ensaio com caldo EC com resultado negativo para coliformes fecais



9. Plaqueamento para contagem de fungos filamentosos e leveduras



10. Placas com resultado negativo para fungos filamentosos e leveduras

APÊNDICE D- Algumas imagens da Caracterização físico-química e do rendimento do requeijão



1. Resultado da análise lipídeo



2. Etapa da digestão de proteína



3. Pesagem da amostra e cápsula de porcelana na análise de umidade



4. Pesagem da amostra para análise de cinzas



5. Rendimento do requeijão igual a 346 g