

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**Influência de uma cultura *starter* termofílica sobre a viabilidade de
Lactobacillus acidophilus e as características de queijo minas frescal
probiótico**

Cínthia Hoch Batista de Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cíntia Hoch Batista de Souza

Influência de uma cultura *starter* termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dr^a Susana Marta Isay Saad
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, Sonia, por ter me ensinado o verdadeiro significado da vida e o verdadeiro valor das pessoas....

Por ter me apoiado incondicionalmente em todas as minhas decisões, sem hesitar...

Por todo o seu imenso amor, pelo seu carinho e por me oferecer a mais sincera amizade que já conheci....

Ao meu amado pai, Alfredo, por todo seu amor e sua dedicação.

Pelo apoio e presença constantes em minha vida, sempre me alegrando, auxiliando e aconselhando, durante todos os momentos desta caminhada....

Com todo meu carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida, por ter me feito acreditar, persistir e lutar. Por ter me confortado a todo momento e por sempre ter me dado a certeza de que eu venceria.

À minha mãe Sonia, por todo seu amor, carinho, amizade e compreensão. Por seu exemplo de força e perseverança. Mãe, obrigada por estar ao meu lado, a cada dia, a cada minuto, me dando força pra lutar e seguir em frente, mesmo a 500Km de distância. Você foi essencial nesta etapa!!!! Essa conquista também é sua!!!

Ao meu pai, Alfredo, exemplo de garra, honestidade, um ser humano admirável. Pai, obrigada pelos ensinamentos, por estar do meu lado e por todo seu apoio. Você é fundamental na minha vida!!!

À minha amada avó Elizene, por ser tão minha amiga, por estar tão presente em todas as fases da minha vida. Por toda a sua participação e toda a sua torcida, muito obrigada!!!!

Aos meus queridos irmãos Alfredo e Rafael, por me admirarem tanto e me darem tanta força. Mesmo tão longe, mas tão presentes. Obrigada, pela grande amizade de vocês e por me fazerem rir a minha vida toda.

Ao Mário, pelo apoio incondicional em todos os momentos desta caminhada, por toda a sua participação e ajuda, por estar sempre tão presente e pelas vezes que me ouviu e me aconselhou.

À querida tia Têre, por toda a torcida, orações e por estar tão presente na minha vida, sempre do meu lado. Por todas as vezes que se alegrou com minhas conquistas e me apoiou. Obrigada, minha amiga, por tudo, tudo, tudo!!!

Aos meus queridos primos Daniel, Thais e Camila, por todo amor, amizade e convivência, tão intensa, mesmo de longe.

À minha orientadora, professora Dr^a Susana Marta Isay Saad, pela orientação, amizade e dedicação. Por ter acreditado em mim, quando eu ainda era uma aluna de graduação e a procurei para uma orientação para o mestrado. Obrigada, professora, por acreditar no meu trabalho e por ter me ajudado a tornar tudo isto possível.

Ao professor Dr. Adalberto Pessoa Júnior, pelo incentivo antes de iniciar o mestrado e durante todo o curso.

Ao professor Dr. Pedro de Oliva Neto, por ter me ensinado a dar os primeiros passos no campo da pesquisa científica e por toda sua amizade.

Ao André, grande amigo, companheiro, parceiro de verdade. Obrigada por tudo, meu amigo, por todas as conversas, risadas, viagens, e-mails, telefonemas. Nossa, tanta coisa, né?! Você sabe que tem um lugar especial na minha vida. Você fez valer a pena!!!!!!Valeu!!!

Ao Lukinha, pela agradável convivência, pela alegria diária mesmo durante o interminável trabalho de laboratório. Obrigada, pelas risadas e por muitas vezes tornar o dia mais “leve”.

Aos amigos Chuei pela sua amizade sincera, pelos momentos de descontração; pelas conversas e risadas na hora do almoço ou do cafezinho, e à Raquel, pelas risadas (muitas!!), por sua amizade e seu companheirismo, na USP e também em casa.

À Dani, minha querida amiga, por estar do meu lado, mesmo quando o mestrado ainda estava nos meus planos. Por toda a sua amizade e apoio, mesmo à distância.

À Fabi, minha grande amiga, por sempre estar disposta a me ouvir, me ajudar, pelos conselhos. Por me ajudar a manter viva esta amizade de tantos anos. Obrigada minha amiga, por mesmo de longe, ter participado tanto das minhas conquistas!!!

Aos meus queridos amigos Érika, Gú, Marquinhos, Jú Nakamuta e Osmar, pelo carinho e amizade, tão importantes para mim.

Aos colegas do departamento pela convivência.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, pelo auxílio, quando precisei. Aos secretários da pós-graduação Jorge e Elaine, pelo profissionalismo e pelo imenso carinho com que sempre me receberam. Aos funcionários da informática, Auriluce e Renato pelo suporte técnico.

À Adriana de Almeida Barreiros, pelo auxílio nas correções das referências bibliográficas.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Bolsa e Auxílio à Pesquisa, processos nº 03/10017-6 e 05/50045-4).

À CAPES, pelo apoio financeiro – PROAP

Às empresas Danisco, Christian Hansen, Purac Sínteses e Salute, pelo fornecimento de culturas, ácido láctico e leite utilizados neste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

***A mente que se abre a
uma nova idéia jamais volta
ao seu tamanho original.***

(Albert Einstein)

***Sem o esforço da busca,
é impossível a alegria
do encontro.***

RESUMO

Os alimentos funcionais probióticos contêm microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem saúde ao hospedeiro. Diversos tipos de queijos, incluindo os queijos frescos, têm se revelado adequados como veículos para a incorporação de bactérias probióticas. O presente trabalho teve como objetivos: verificar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 em queijo minas frescal processado com a adição desse microrganismo probiótico associado a uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e verificar a influência de um teor reduzido de gordura sobre essa viabilidade; avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental, durante o seu armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 21 dias, em comparação ao queijo preparado com a adição isolada de *L. acidophilus* e ao queijo controle (sem adição de culturas). Três queijos foram produzidos (em triplicata) com leite integral e por acidificação direta com ácido láctico: T1 (controle), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*). T2 e T3 também foram produzidos (em triplicata) com leite desnatado, para o monitoramento da viabilidade do probiótico em queijo com teor reduzido de gordura (T2L e T3L). T1, T2 e T3 foram avaliados sensorialmente, após 7 e 14 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. As características físico-químicas (umidade, acidez titulável e pH), microbiológicas (sobrevivência do microrganismo probiótico, *starter* e a população de contaminantes - coliformes, *E. coli* e *Staphylococcus* spp.) e a textura instrumental (teste de dupla compressão de amostras cilíndricas, em texturômetro TA-XT2, Stable Micro System) desses queijos foram monitoradas durante o armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 21 dias. Além disso, o índice de extensão da proteólise foi avaliado entre o 1º e o 21º dia de armazenamento.

Os queijos T2, T3, T2L e T3 apresentaram populações de *L. acidophilus* acima do mínimo recomendado para um alimento probiótico (6 log UFC/g), exceto para T3, que apresentou populações de 5,74 log UFC/g ao 1º dia de armazenamento. Ao 14º dia, T2 alcançou populações de 7,04 log UFC/g; T2L e T3L apresentaram populações superiores aos demais queijos durante a produção (dia 0), permanecendo com populações acima de 7 log UFC/g entre o 7º e o 21º dia de armazenamento. A adição de culturas impediu a multiplicação de *Staphylococcus* spp. nos queijos T2 e T3, enquanto que T1 apresentou aumento nessas populações ao longo do armazenamento. Todos os queijos apresentaram aumento na proteólise durante o armazenamento ($p < 0,05$). Entretanto, o maior aumento ocorreu em T3, devido à presença da cultura *starter* ($p < 0,05$). A análise sensorial revelou que a adição de *L. acidophilus* resultou em benefícios sensoriais aos produtos, uma vez que as características sensoriais de T2 e T3 mantiveram-se estáveis, com boa aceitação após 7 e 14 dias de armazenamento, enquanto que T1 obteve menor aceitação no mesmo período ($p < 0,05$). A suplementação de queijo minas frescal com *Lactobacillus acidophilus* La-5, isoladamente ou em co-cultura com uma cultura *starter* termofílica (*S. thermophilus*), resultou em um produto potencialmente funcional, com populações acima do mínimo requerido para um produto probiótico (particularmente quando produzido com leite com um teor reduzido de gordura), apresentando propriedades sensoriais, microbiológicas e de textura adequadas e superiores aos queijos produzidos somente com acidificação direta do leite com ácido láctico.

ABSTRACT

Functional foods are foods that claim to promote human health over and above the provision of basic nutrition. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host, improving his intestinal microbial balance. *Lactobacillus acidophilus* strains have been shown to be able to survive at favorable concentrations for a probiotic food in a variety of cheeses, including fresh cheeses. The objective of this study was to verify the viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a *Streptococcus thermophilus* starter culture during production of minas fresh cheese.

Three different trials of minas fresh cheese were prepared (in triplicates): T1 (produced with no addition of cultures), T2 (supplemented with *L. acidophilus*) and T3 (supplemented with *L. acidophilus* + *S. thermophilus*). T2 and T3 were also produced with reduced fat milk in order to verify the influence of reduced fat on viability of *L. acidophilus* added to minas fresh cheese (T2L and T3L). The physicochemical (moisture, pH and titratable acidity) and microbiological (counts of *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, coliforms, *E. coli* and *Staphylococcus* spp.) properties were monitored during 21 days of refrigerated storage at $5\pm 1^\circ\text{C}$. The instrumental texture profile (TA-XT2 Texture Analyser) was also determined. In addition, the proteolytic index after the 1st and the 21st day of storage was determined. Counts of *L. acidophilus* and *S. thermophilus* were also monitored in cheeses T2L and T3L. Sensory evaluation was performed for cheeses T1, T2 and T3, after 7 and 14 days of storage at $5\pm 1^\circ\text{C}$, employing the acceptability test, with a 9-point hedonic scale, by 30 untrained panelists. All cheeses supplemented with *L. acidophilus* presented populations above 6 log cfu/g, during the whole storage period, except for T3, which presented counts of 5.74 log cfu/g, but only in the 1st day of storage. Cheeses T2L and T3L, presented initial counts above 6 log cfu/g, which increased after the 7th day of storage, remaining above 7 log cfu/g up to the last day of storage. Cheeses produced only through direct acidification of milk (T1) presented increase in counts of *Staphylococcus* spp. during storage, whereas the presence of lactic acid cultures inhibited the growth of these contaminants in cheeses T2 e T3. All cheeses presented an increase in the proteolytic index between the first and the last day of storage. However, the major increase was detected for T3 (95.4%) due to the presence of *S. thermophilus*. With respect to sensory evaluation, no significant differences were detected among cheeses after 7 days of storage ($p>0.05$). After 14 days, cheeses T2 and T3 presented higher acceptance and differed significantly from cheeses T1. A decrease in acceptability was observed for cheeses T1 between 7 and 14 days of storage ($p<0.05$), whereas probiotic cheeses T2 and T3 revealed to be stable in the same period ($p>0.05$). The supplementation of minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* La-5, either solely or in co-culture with a thermophilic starter culture (*S. thermophilus*), resulted in a product with great potential as a functional food, with populations above the minimum required for a probiotic product (particularly when produced with reduced fat milk), improving sensory performance of the product during storage, as well as microbiological and textural properties.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis empregadas na fabricação do queijo minas frescal.....	32
Tabela 2. Composição centesimal e umidade (média ± desvio - padrão) obtidos para os queijos T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), no produto final (matéria úmida) – após 1 dia de armazenamento a 5±1°C.....	42
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média ± desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), no produto final (1 dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 5±1°C.....	43
Tabela 4. Populações de <i>Lactobacillus. acidophilus</i> La-5 (média e variação) obtidas para os queijos T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.....	49
Tabela 5. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (média e variação) obtidas para os queijos T2L (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3L (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), produzidos com leite desnatado, durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.....	53
Tabela 6. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (média) obtidas para os queijos T2 e T2L (adição de <i>L. acidophilus</i>) produzidos com leite integral (T2) e desnatado (T2L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.....	56
Tabela 7. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (média) obtidas para os queijos T3 e T3L (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>) produzidos com leite integral (T3) e desnatado (T3L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.....	56
Tabela 8. Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média e variação) obtidas para o queijo T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.....	59
Tabela 9. Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média e variação) obtidas para o queijo T3L (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), produzido com leite	

desnatado, durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	62
Tabela 10. Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média) obtidas para os queijos T3 e T3L (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>) produzidos com leite integral (T3) e desnatado (T3L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	62
Tabela 11. Populações de <i>Staphylococcus</i> spp. (média e variação) obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	64
Tabela 12. Populações de coliformes totais (média e variação) obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	66
Tabela 13. Índice de extensão da proteólise (média \pm desvio-padrão) no produto final (dia 1) e após 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e o aumento da proteólise durante a estocagem para os diferentes queijos minas frescal estudados.....	70
Tabela 14. Perfil de textura instrumental (média \pm desvio-padrão) ¹ dos queijos T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), no produto final (1 dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	72
Tabela 15. Grupos homogêneos para os diferentes tipos de queijo minas frescal: T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), após 14 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	78
Tabela 16. Resultados do Teste de Friedman para a análise sensorial realizada para os diferentes tipos de queijo minas frescal: T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de <i>L. acidophilus</i>) e T3 (adição de <i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), após 14 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Etapas principais empregadas na fabricação de queijo minas frescal e diferentes tratamentos empregados.....33
- Figura 2.** Analisador de Textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra).....38
- Figura 3.** Efeito da acidificação na agregação das micelas de caseínas e na expulsão do soro.....46
- Figura 4.** Valores do rendimento médio obtido a partir de 3 produções de cada queijo estudado: T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*).....48
- Figura 5.** Gráfico da análise do perfil de textura obtido para o queijo minas frescal T2. Dureza = H; Coesividade = A_2/A_1 ; Adesividade = A_3 ; Elasticidade = T_2/T_1 ; Mastigabilidade = $H \times (A_2/A_1) \times (T_2/T_1)$ e Gomosidade = $H \times (A_2/A_1) \times 100$.
.....71
- Figura 6.** Frequência das notas obtidas para os tratamentos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), na análise sensorial conduzida após 7 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$77
- Figura 7.** Frequência das notas obtidas para os tratamentos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), na análise sensorial conduzida após 14 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$79
- Figura 8.** Percentagens de notas obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), nas análises sensoriais conduzidas após 7 e 14 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Os alimentos funcionais.....	14
1.2. Os alimentos funcionais probióticos	15
1.3. Os microrganismos probióticos, seu papel na microbiota intestinal e sua influência sobre a saúde do hospedeiro	16
1.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
1.5. <i>Streptococcus thermophilus</i>	20
1.6. Os produtos lácteos probióticos.....	22
1.7. A possível influência de produtos lácteos com teor reduzido de gordura sobre a sobrevivência de probióticos	24
1.8. Aspectos gerais sobre a fabricação e comercialização de queijos	25
1.9. Aspectos tecnológicos da fabricação de queijo minas frescal	26
1.10. O queijo minas frescal como produto com potencial probiótico	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Fabricação do queijo minas frescal	32
3.2. Avaliação do rendimento do processo e determinação da composição centesimal dos queijos	34
3.3. Armazenamento e períodos de amostragem.....	35
3.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos.....	36
3.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento	37
3.6. Determinação do perfil de textura instrumental	37
3.7. Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	38
3.8. Determinação do Índice de Extensão da Proteólise	38
3.8.1. Determinação de nitrogênio total.....	39
3.8.2. Determinação de nitrogênio solúvel.....	40
3.8.3. Cálculo do índice de extensão da proteólise	40
3.9. Delineamento experimental e análise estatística.....	40
3.10. Análise sensorial.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Composição centesimal.....	42

4.2. Parâmetros físico-químicos	42
4.3. Rendimento das produções	47
4.4. Parâmetros microbiológicos	49
4.4.1. Viabilidade da bactéria probiótica	49
4.4.2. Viabilidade da bactéria <i>starter</i>	58
4.4.3. Bactérias indicadoras de contaminação - <i>Staphylococcus</i> spp., coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	63
4.5. Índice de extensão da proteólise	67
4.6. Textura instrumental	70
4.7. Análise sensorial	76
5. CONCLUSÕES	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os alimentos funcionais

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.

As pesquisas com alimentos funcionais começaram no início da década de 80 no Japão. Depois, em 1991, a denominação legal do alimento funcional foi estipulada de acordo com o sistema “Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde” (Food for Specific Health Use – FOSHU) (ROBERFROID, 2000; STANTON *et al.*, 2005).

Os alimentos funcionais são alimentos modificados (compreendendo também os ingredientes alimentares), semelhantes 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 crônico-degenerativas (LAJOLO, 1999; BERGAMINI *et al.*, 2005; MICHIDA *et al.*, 2006).

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). 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. 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).

1.2. Os alimentos funcionais probióticos

Os probióticos possuem uma longa história de uso: os primeiros registros da ingestão de bebidas contendo microrganismos probióticos datam de 2000 anos atrás (GIBSON, 2004). O desenvolvimento do conceito de probióticos é atribuído a Metchnikoff, que observou que o consumo de leites fermentados poderia reverter efeitos putrefativos da microbiota intestinal (STANTON *et al.*, 2005).

Os probióticos, que fazem parte do grupo de alimentos chamados funcionais, contêm microrganismos 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).

A alimentação balanceada e adequada tem a função de proporcionar ao organismo uma saúde física e mental. Os alimentos podem ser modificados e, assim, melhorar a sua função, com a adição de microrganismos não patogênicos. Esses alimentos são denominados probióticos. A função principal dos alimentos probióticos, além de nutrir, é realizar a reposição de uma microbiota normal que foi desbalanceada pela dieta, uso de drogas e /ou situações de estresse do hospedeiro (TESHIMA, 2003).

O termo probiótico significa “para a vida” e é utilizado para designar a presença de bactérias benéficas para o organismo humano em alimentos. Em meados de 1907, Henry Tissier observou que crianças com diarreia apresentavam, em suas fezes, um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar – as bifidobactérias. Estas bifidobactérias eram abundantes em crianças saudáveis. Ele sugeriu que essas bactérias poderiam ser administradas em pacientes com diarreia, com a finalidade de ajudar a restaurar a microbiota intestinal saudável, prevenindo assim infecções infantis (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; STANTON *et al.*, 2005).

Os alimentos mais utilizados como veículos de microrganismos probióticos são geralmente alimentos fermentados, embora os probióticos também possam estar presentes em fórmulas infantis, suco de frutas, *sweet milk* e bebidas à base de soro de leite (*whey drinks*). Leites fermentados e queijos são os alimentos mais comuns contendo probióticos (SAARELA *et al.*, 2000).

1.3. Os microrganismos probióticos, seu papel na microbiota intestinal e sua influência sobre a saúde do hospedeiro

O trato gastrointestinal humano consiste da boca (cavidade oral), faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e cólon (SPENCE, 1991). Em termos de população microbiana, o estômago possui números muito baixos de microrganismos, que compreendem basicamente microrganismos anaeróbios facultativos, como *Lactobacillus*, *Streptococcus* e leveduras, estas presentes em populações menores devido ao baixo pH. O intestino delgado é formado por um ecossistema bastante diversificado, que consiste de microrganismos anaeróbios facultativos, como *Lactobacillus*, *Streptococcus* e enterobactérias, além de anaeróbios como *Bifidobacterium* spp., *Bacteróides* spp. e clostrídios. Entretanto, a região do trato gastrointestinal mais densamente colonizada é o cólon, que possui uma população microbiana total entre 10^{11} e 10^{12} UFC/ml, formando um ecossistema complexo com mais de 500 diferentes tipos de bactérias, incluindo as enterobactérias pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Escherichia* e *Staphylococcus*, entre outros (ZIEMER & GIBSON, 1998; RASTALL & MAITIN, 2004; VOROBEVA, 2005).

A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro e, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos presentes exerçam seus efeitos patogênicos. As funções principais desta microbiota natural do organismo humano são: a proteção ecológica (impedindo a proliferação de microrganismos patogênicos), a imunomodulação (resposta rápida e adequada do sistema imune à agressões infecciosas) e a contribuição nutricional (regula a fisiologia digestiva, fornece vitaminas e fontes energéticas). Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Os probióticos eram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são

microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado “exclusão competitiva”. Através desse mecanismo, os probióticos impedem a colonização dessa mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos, através da competição por sítios de adesão na mucosa intestinal, da competição por nutrientes necessários para a multiplicação de microrganismos indesejáveis e/ou os efeitos antagônicos, através da produção de compostos antimicrobianos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). Além disso, a influência benéfica dos microrganismos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui outros fatores, como a degradação, inibição da síntese e ação de toxinas patogênicas, efeitos imunológicos (aumentando a resistência à infecções) e produção de muco (NICOLI *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2004).

Esse conjunto de mecanismos resulta em um aumento da resistência contra patógenos, garantindo, assim, a presença dos microrganismos de atividade benéfica à saúde e impedindo a manifestação dos chamados patogênicos (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 naturais de defesa do hospedeiro. Essa resistência aumentada contra patógenos é a característica mais promissora no desenvolvimento de probióticos eficazes (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002).

Adicionalmente, dados experimentais indicam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa – através de resposta imune no tecido linfóide associado ao intestino, resultando na circulação de células T (que atuam contra antígenos externos) e células B (que produzem anticorpos), com conseqüente ativação da imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal (FIORAMONTI *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2004), além de estarem envolvidos na produção de certas vitaminas do complexo B (GORBACH, 2000). 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 humanos. Esses novos métodos de tratamento ganham destaque diante

do quadro preocupante da resistência a antibióticos, cada vez maior entre os microrganismos patogênicos (NICOLI & VIEIRA, 2000).

Os microrganismos, no entanto, para serem considerados probióticos, além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, devem atender aos seguintes requisitos: sobreviver à passagem através do trato digestivo e também possuir a capacidade de se desenvolverem no intestino. Isto significa que eles devem resistir ao pH baixo, suco gástrico e pancreático e à bile (PUPIN, 2002). Entretanto, somente uma pequena percentagem das cepas potencialmente probióticas, geralmente menos que 10%, são capazes de resistir e se multiplicar sob estas condições (COEURET *et al.*, 2004). Além disso, devem possuir aderência ao epitélio intestinal, ter origem na microbiota intestinal humana sadia, apresentar capacidade de estabilizar a microbiota intestinal e possuir propriedades antigenotóxicas e não-patogênicas (GOLDIN, 1998; GUARNER *et al.*, 2005).

Entretanto, REID *et al.* (2003) defenderam que os efeitos funcionais destes microrganismos, como, por exemplo, diminuição do colesterol e modulação do sistema imune, implica em uma definição de probióticos na qual este termo seja aplicado somente a microrganismos vivos que possuam um efeito benéfico substanciado. Sendo assim, segundo os autores, microrganismos com efeitos benéficos comprovados em humanos e que são administrados vivos passam a ser considerados probióticos, independentemente da sua capacidade de sobreviver ou não ao trânsito intestinal. Desta maneira, cepas ou espécies que não sobrevivem ao trânsito intestinal, como por exemplo, *Streptococcus thermophilus*, podem ser consideradas probióticas. SANDERS (2003) considera *S. thermophilus* como sendo uma cultura probiótica, devido a sua capacidade de liberar lactase no intestino delgado, embora não resista ao trânsito intestinal. Esse novo conceito apresenta-se como uma grande modificação nas definições de microrganismos probióticos anteriormente aceitas, principalmente quando considerados alguns dos pré-requisitos para que um microrganismo seja considerado probiótico, ou seja, sobreviver à passagem pelo intestino e aderir ao epitélio intestinal.

Em contrapartida, estudos recentes conduzidos por MATER *et al.* (2005), comprovaram a recuperação de células viáveis de *S. thermophilus* em fezes humanas após a ingestão de iogurte. Em pesquisas realizadas com ratos, DROUULT *et al.* (2002) verificaram que, embora *S. thermophilus* não se multiplique no intestino, resiste à passagem pelo trato gastrointestinal, além de produzir β -galactosidase, melhorando a

má absorção da lactose. Essa ação é fundamental, particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, os quais são incapazes de digerir a lactose adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal em grau variável (LOURENS - HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável. O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHARTERIS *et al.*, 1998; BIELECKA *et al.*, 2002).

1.4. *Lactobacillus acidophilus*

Muitos estudos têm evidenciado o papel benéfico de *Lactobacillus acidophilus* no hospedeiro; células de *L. acidophilus* vivas e também mortas pelo calor foram efetivas na inibição da adesão de patógenos *in vitro* (COCONNIER *et al.*, 1993). Além disso, *L. acidophilus* La-1 mostrou efeitos antimicrobianos contra *Helicobacter pylori* (MICHETTI *et al.*, 1999). Alguns estudos realizados com crianças demonstraram que a administração de *L. acidophilus* sozinho, e também, juntamente com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* demonstraram eficácia em estudos pediátricos, sendo as duas formulações indicadas para o tratamento da diarreia aguda. *L. acidophilus* juntamente com *Bifidobacterium infantis* demonstraram um decréscimo na incidência de enterocolite em recém nascidos, como conseqüência da inibição do processo inflamatório (YOUNG & HUFFMAN, 2003).

Segundo SERVIN & COCONNIER (2003), cepas de *Lactobacillus* isoladas no trato digestivo humano revelaram-se capazes de inibir 4 espécies de bactérias anaeróbicas conhecidas como agentes etiológicos de infecções gastrentéricas: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Clostridium difficile*. Estudos *in vitro* realizados com *L. acidophilus* e outros representantes dos grupos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* revelaram a inibição da multiplicação de *H. pylori* isolados de casos clínicos. Além disso, *L. acidophilus* foi ativo contra infecções experimentais com *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* e *Shigella flexneri* em

ratos gnobióticos, além de conferir proteção contra infecções estomacais com *H. felis*, inibindo a colonização do estômago e eliminando lesões gástricas.

L. acidophilus, juntamente com as bifidobactérias, são os microrganismos probióticos mais utilizados na tecnologia de produtos lácteos (SAARELA *et al.*, 2000). Entretanto, deve ser salientado que os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina. Em outras palavras, probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da eficácia através de ensaios em humanos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). É o caso da cepa La-5 de *L. acidophilus*, cujo efeito probiótico em humanos é bem documentado (JUNTUNEN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004). Testes de tolerância em animais para a espécie *Lactobacillus acidophilus* demonstraram que a cepa é segura na proporção de 50 g/Kg por dia para ratos, que pode ser extrapolado para 35 gramas diárias para uma pessoa de 70 Kg (REID *et al.*, 2003).

1.5. *Streptococcus thermophilus*

Algumas espécies de *Streptococcus* compreendem microrganismos patogênicos letais para o ser humano, como, por exemplo, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. agalactiae*. Entretanto, *S. thermophilus* é uma espécie considerada *generally recognised as safe* (GRAS), sendo que anualmente são ingeridas acima de 10^{21} células vivas desse microrganismo pela população humana (HOLS *et al.*, 2005).

Atualmente, são conhecidas 39 espécies de *Streptococcus*, das quais somente a espécie *Streptococcus thermophilus* é utilizada como cultura *starter*. O termo *starter* é empregado, devido ao fato destas bactérias iniciarem a produção de ácido no meio em que estão inseridas. A partir da fermentação da lactose, as culturas de *Streptococcus thermophilus* produzem substâncias como o ácido fórmico, ácido láctico e, em pequenas quantidades, CO₂ (FOX *et al.*, 2000; ZISU & SHAH, 2003).

Por ser extensivamente utilizada na produção de produtos lácteos, a cultura de *S. thermophilus* é de grande importância para a indústria alimentícia e é considerada a segunda cepa *starter* de uso mais importante depois de *Lactococcus lactis* (HOLS *et al.*, 2005). As culturas de *Streptococcus thermophilus* são comumente aplicadas na

fabricação de diversos produtos lácteos, como iogurtes, queijos tipo emmental, queijos suíços e queijos tipo italiano, para facilitar o processo de fermentação (HUSSON-KAO *et al.*, 2000). Além disso, são empregadas diretamente ou em co-cultura com *Lactobacillus* na produção de mussarela e queijo cheddar (HOLS *et al.*, 2005). Em função da perda da viabilidade da bactéria probiótica, a adição de culturas *starter* em produtos probióticos é aconselhável (FOX *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A adição de culturas a produtos lácteos pode conferir alterações de sabor e textura aos mesmos, devido à autólise bacteriana, fenômeno que é caracterizado pela lise da célula, onde há a liberação de todo o conteúdo citoplasmático da mesma. Quando ocorre nas células de culturas *starter*, a autólise parece ser uma maneira promissora para melhorar o sabor de produtos lácteos onde elas estão inseridas. Células de *Streptococcus thermophilus* sofrem autólise extensivamente ao longo da sua multiplicação (HUSSON-KAO *et al.*, 2000). SHAH (2000) esclarece que culturas *starter*, assim como culturas probióticas, influenciam as características físico-químicas e sensoriais dos queijos. Uma das modificações que estas culturas podem causar nos queijos é a quebra das proteínas (proteólise), que resulta em modificações na sua matriz (SOUSA *et al.*, 2001).

Muitas cepas de *S. thermophilus* sintetizam polissacarídeos extracelulares. A produção desses polissacarídeos durante a fermentação do leite melhora a textura viscosa do produto fermentado, que contribui para a percepção do sabor e da textura, tipicamente associados com determinados produtos lácteos fermentados. Além disso, a produção de polissacarídeos extracelulares pode contribuir na manutenção de propriedades de textura e evitar a sinerese em produtos com níveis reduzidos de gordura, como iogurte, *sour cream* ou queijos (HOLS *et al.*, 2005).

Recentemente, pesquisas têm apontado *S. thermophilus* como sendo uma espécie probiótica, em virtude do seu efeito de distribuição de lactase no intestino delgado, efeito este reconhecido como uma atividade probiótica, embora *S. thermophilus* não sobreviva ao trânsito intestinal (REID *et al.*, 2003; SANDERS, 2003). Em contrapartida, DROUULT *et al.* (2002) e MATER *et al.* (2005) defendem que *S. thermophilus* é capaz de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal. Embora *S. thermophilus* recentemente seja classificado como uma cultura probiótica, não possui outras características desejáveis para uma cepa probiótica, como por exemplo, possuir origem na microbiota intestinal humana sadia (SHAH, 2000).

1.6. Os produtos lácteos probióticos

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 & FLEET, 1997; VINDEROLA & 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 & SALMINEN, 1995; BLANCHETTE, 1996; HOIER *et al.*, 1999).

Além disso, é interessante que estes novos produtos sejam resultantes de pequenas ou de nenhuma alteração nas tecnologias tradicionais de produção, para que se tornem produtos atrativos comercialmente (BOYLSTON *et al.*, 2004). A Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 1999) recomendou que um alimento funcional probiótico deve apresentar uma concentração mínima de 10^6 UFC/g dentro do prazo de validade do produto (ANVISA, 2001). Entretanto, no momento, a referida Comissão estabeleceu que a quantidade mínima diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC (ANVISA, 2006). Paralelamente, de acordo com a legislação brasileira atual, diversas alegações são aprovadas e vários microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são listados como sendo probióticos, além dos *starters* *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ANVISA, 2005).

Diversas cepas probióticas são utilizadas para o processamento de produtos alimentícios. Essas cepas devem passar por uma seleção adequada para serem adicionadas durante a fabricação de produtos lácteos probióticos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003). Deve-se salientar, também, que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive, para outras cepas da mesma espécie (GUARNER & MALAGELADA, 2003).

GARDINER *et al.* (1999) alegaram que os produtos como leites fermentados e iogurtes podem não ser ótimos para a manutenção de altas concentrações de algumas cepas probióticas. Alguns estudos evidenciam que outros alimentos oferecem potencial para a administração e desenvolvimento dessas culturas, como o leite de soja fermentado (SVENSSON, 1999), sorvete e o sorvete de iogurte (DAVIDSON *et al.*, 2000), produtos nutritivos em pó (INGHAM, 1999), alimentos de origem vegetal fermentados, sucos, maioneses, além de diversos tipos de queijos (STANTON *et al.*, 1998; GARDINER *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002; STANTON *et al.*, 2003; LUCKOW & DELAHUNTY, 2004).

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). Muitos estudos com a adição de culturas probióticas a tipos diferentes de queijos foram realizados, concluindo favoravelmente sobre a produção deste tipo de produto probiótico. Dentre os queijos estudados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, destacam-se os queijos cheddar (DINAKAR & MISTRY, 1994; GARDINER *et al.*, 1998), gouda (GOMES & MALCATA, 1998), cottage (BLANCHETTE *et al.*, 1996), crescenza (GOBBETTI *et al.*, 1997) e queijo fresco (ROY *et al.*, 1997; VINDEROLA *et al.*, 2000b), incluindo o queijo minas frescal (BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b).

Um estudo realizado com o queijo tipo cheddar utilizou a cepa probiótica *Enterococcus faecium* e demonstrou melhor capacidade tamponante que o iogurte, oferecendo proteção à cultura probiótica com relação à exposição ao suco gástrico (GARDINER *et al.*, 1999). Os autores relataram que o queijo cheddar é tão ou mais eficiente que o iogurte como veículo de microrganismos probióticos, mesmo após 15 meses de fabricação. Paralelamente, GOMES & MALCATA (1999) concluíram que o processamento de queijo de leite de cabra com a adição das culturas probióticas *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, pode ser empregado para obtenção de um produto com boas características de sabor e textura, com populações finais desses microrganismos acima de 10^6 UFC/g.

1.7. A possível influência de produtos lácteos com teor reduzido de gordura sobre a sobrevivência de probióticos

Dietas gordurosas, especialmente de origem animal têm sido consideradas como uma das maiores causas de perigo à saúde, e estão relacionadas ao surgimento e aumento de doenças como câncer, obesidade, doenças cardiovasculares, pressão alta e diabetes (KAYROOZ *et al.*, 1998, RYHÄNEN *et al.*, 2001, MICHAELIDOU *et al.*, 2003).

Embora os produtos à base de leite sejam favoráveis quanto à presença de nutrientes importantes para a dieta, incluindo o ácido linoléico, cálcio, proteínas, riboflavina, aminoácidos, vitamina A e também vitamina D, em leites suplementados, a indústria de produtos lácteos enfrenta o problema da associação feita entre os produtos lácteos e o aumento das concentrações de colesterol (AIGSTER *et al.*, 2000). Por esses motivos, produtos livres e com baixas concentrações de gorduras são cada vez mais populares atualmente entre os consumidores (RYHÄNEN *et al.*, 2001).

RYHÄNEN *et al.* (2001) estudaram o desenvolvimento de um novo tipo de queijo, denominado festivo, adicionado de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.) e com baixa concentração de gordura, na tentativa de produzir um alimento mais saudável que, além de possuir propriedade probiótica, apresentasse baixa concentração de gordura. A gordura do produto foi diminuída em aproximadamente 11%. Como resultado dessa diminuição, os pesquisadores obtiveram as mesmas características organolépticas do produto, o qual obteve boas notas na análise sensorial em relação à aparência, sabor, textura e aceitação geral. Além disso, as bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. permaneceram viáveis por até 7 meses, com populações de 10^6 UFC/g, satisfazendo, assim, a concentração mínima de células necessárias para um efeito probiótico.

VINDEROLA *et al.* (2000a) afirmaram que o teor reduzido de gordura é um meio favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias probióticas. Por outro lado, alguns trabalhos afirmam que o pH, a atividade de água, a matriz sólida dos queijos e a concentração relativamente alta de gordura presente podem oferecer proteção às bactérias probióticas durante a sua passagem pelo trato gastrintestinal. Baseados nessa observação, os autores sugeriram que o queijo é o produto mais adequado como veículo para os probióticos, quando comparados a leites fermentados e iogurtes

(GARDINER *et al.*, 1998; STANTON *et al.*, 1998; DAIGLE *et al.*, 1999; CORBO *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2003; BOYLSTON *et al.*, 2004; BERGAMINI *et al.*, 2005).

HELLER *et al.* (2003) afirmaram que o encaixe da bactéria probiótica na matriz lipoprotéica do queijo confere uma capacidade tamponante do queijo durante a sua passagem pelo trato gastrintestinal, o que auxilia na sobrevivência dos probióticos, aliada à baixa acidez do produto. Aparentemente, a matriz dos queijos é muito eficaz na proteção da bactéria probiótica contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares.

Quando comparados aos iogurtes, o problema de se utilizar o queijo como um veículo de bactérias probióticas está na alta concentração de gordura e sal presentes no produto, o que faz com que a recomendação diária de consumo seja baixa. Entretanto, os queijos frescos podem ser facilmente ajustados a baixas concentrações de gordura e sal. Sendo assim, a recomendação de ingestão diária passa a ser um tanto quanto maior que o produto contendo maior teor de sal e gordura (HELLER *et al.*, 2003).

1.8. Aspectos gerais sobre a fabricação e comercialização de queijos

O Brasil está deixando para trás a tradição de ser um grande importador de produtos lácteos. Prova disto é que em maio de 2004, a balança comercial de lácteos foi superavitária, em US\$ 821,5 mil. No mesmo período, o país exportou o equivalente a 4,3 mil toneladas de leite (DIÁRIO, 2006). 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. A maior parte dessa produção é feita em pequenas e médias queijarias. Em algumas regiões do estado, o setor queijeiro emprega cerca de 30 mil famílias de pequenos proprietários rurais e movimenta mensalmente algo em torno de 10 milhões de reais (PERRY, 2004).

Após a década de 90, a produção de queijos aumentou em cerca de 15%. Dados de 2001 indicam que a produção de leite no Brasil passou por um importante aumento, alcançando 22 milhões de quilos, sendo 60% deste total destinado à fabricação de queijos (CICHOSCKI *et al.*, 2002). Estes dados ilustram bem a importância social e econômica do produto.

1.9. Aspectos tecnológicos da fabricação de queijo minas frescal

O queijo minas frescal é originário do estado brasileiro de Minas Gerais e é o 3º queijo mais produzido no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2005). É definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como sendo um queijo fresco, obtido por coagulação enzimática do leite (que deve ser pasteurizado ou submetido a tratamento térmico equivalente), com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas, na forma de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. É um queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico Geral de Identidade e Qualidade de Queijos. Possui consistência macia; com ou sem olhaduras mecânicas, cor esbranquiçada, sem crosta, de sabor suave ou levemente ácido e odor característico. É obtido comercialmente na forma cilíndrica, em peças que variam de 0,3 a 5 kg. O queijo minas frescal deve ser acondicionado a temperaturas não superiores a 8°C e embalado em embalagens plásticas ou acondicionado em embalagens bromatologicamente aptas (ANVISA, 1996).

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece: um queijo com 48% de gordura contém cerca de 23-25% de proteína, o que significa que, em termos de valor protéico, 210 gramas desse produto equivalem a 300 gramas de carne. Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura do queijo. O líquido residual, cujo teor varia com o tipo de queijo, é chamado lactosoro; esse subproduto representa de 85-90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos, retendo aproximadamente 55% dos nutrientes do leite. Grande parte do lactosoro é eliminada durante o processo de fabricação do queijo e aproveitada como matéria-prima na produção de produtos como iogurtes e ricota, dentre outros (PERRY, 2004). Metade da produção mundial de soro é tratada e transformada em vários produtos alimentares, sendo que deste total quase a metade é usada diretamente na forma líquida (ALMEIDA *et al.*, 2001; PERRY, 2004).

A classificação dos queijos baseia-se em características decorrentes do tipo de leite utilizado, do tipo de coagulação, da consistência da massa, do teor de gordura, do tipo de casca, do tempo de cura, etc.

O leite utilizado na produção de queijos frescos precisa ser obrigatoriamente pasteurizado, de boa qualidade e, tanto quanto possível, livre de contaminação bacteriana ou por agentes químicos como antibióticos, herbicidas, pesticidas, etc. No caso dos antibióticos, se estes forem administrados ao gado, passarão ao leite e poderão inibir a sua coagulação ou alterar o tempo de maturação dos queijos devido à alterações na microbiota láctica. 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 presente no estômago de ruminantes jovens. 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, porém, 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. Esse método fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático (PERRY, 2004).

Tradicionalmente, os coalhos utilizados são de origem animal, principalmente bezerros e porcos, entretanto, para atender às necessidades especiais de grupos como os vegetarianos e os muçulmanos, foram desenvolvidos coagulantes de origem vegetal e microbiana. Coagulantes de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos fabricados com este tipo de coalho costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo de armazenamento. Já os coalhos de origem microbiana têm características bastante semelhantes aos de origem animal. Durante a formação da coalhada podem ser adicionados, conforme a necessidade e o interesse do produtor, aditivos como CaCl_2 , aumentando assim o teor de íons Ca^{+2} no leite, acelerando a coagulação da caseína e ajudando a firmar o coágulo (PERRY, 2004).

1.10. O queijo minas frescal como produto com potencial probiótico

O queijo minas frescal é um produto que tem ampla aceitação comercial e que faz parte do hábito alimentar da população brasileira, uma vez que é consumido na

maioria das regiões do país. Possui umas das mais simples tecnologias de fabricação. Mesmo assim, as técnicas industriais foram sofrendo modificações ao longo dos anos, visando à melhoria de qualidade, o aumento no rendimento e a padronização do produto (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; NEVES-SOUZA & SILVA, 2005). É um queijo tipicamente brasileiro, sendo o 3º queijo mais produzido no Brasil, depois dos queijos prato e mussarela (BURITI *et al.*, 2005b). Sua produção aumentou de 17.950 para 31.762 toneladas entre 1991 e 2003 (BURITI *et al.*, 2005b, NEVES-SOUZA & SILVA, 2005).

Alta atividade de água, pH acima de 5,0, baixa concentração de sal e ausência de substâncias conservantes são características deste tipo de queijo, que oferecem excelentes condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas (BURITI *et al.*, 2005b). Tradicionalmente, o queijo minas frescal é produzido com a adição de uma cultura *starter* mesofílica do tipo O, composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Atualmente, os laticínios brasileiros tendem a substituir, parcialmente ou totalmente, a adição dessa cultura pela acidificação direta com 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, conseqüentemente, valores baixos de pH do produto durante o seu armazenamento, bem como a produção de outros compostos antimicrobianos. A adição apenas de ácido láctico resulta na diminuição do pH, a qual se restringe ao processamento, uma vez que facilita a quebra enzimática da κ -caseína pelas enzimas do coagulante (BURITI *et al.*, 2005a).

Entretanto, a utilização de culturas mesofílicas, como a do tipo O, resulta na acidificação excessiva do produto ao longo do armazenamento. Segundo JOHNSON & LAW (1999), as culturas *starter* mesofílicas tendem a fermentar a lactose (ou galactose) residual do queijo em temperaturas normais de armazenamento (6° a 10°C). Por outro lado, segundo os autores, determinadas cepas de *Streptococcus thermophilus*, microrganismo utilizado como cultura *starter* termofílica em diversos tipos de queijo (Ex: mussarela, emmental, gruyère), diminuem a acidificação quando é atingida uma determinada faixa de pH, dependendo do tipo de queijo (5,1-5,3, em queijo muenster).

O desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades probióticas é tema atual de pesquisas, por se tratar de um tema importante para a área da saúde e promissor para a indústria alimentícia. O queijo minas frescal mostrou-se um veículo

apropriado para a incorporação de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 (anteriormente classificada como *Bifidobacterium lactis*) e *Streptococcus thermophilus* em co-cultura (cultura ABT) (OKAZAKI *et al.*, 2001; BURITI *et al.*, 2001), *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 individualmente e em co-cultura (ALEGRO *et al.*, 2002a; BURITI *et al.*, 2005b), *Lactobacillus paracasei* (BURITI *et al.*, 2005a) e *Lactobacillus acidophilus* (BURITI *et al.*, 2005b). Esses microrganismos probióticos revelaram populações superiores ao mínimo requerido para efeito probiótico (10^6 UFC/g) ao longo do período de armazenamento do produto por 21 dias, sob refrigeração. Entretanto, verificou-se que concentrações mais elevadas de *L. acidophilus* foram obtidas ao longo do armazenamento dos queijos quando esse microrganismo probiótico foi adicionado em co-cultura com *Bifidobacterium animalis* Bb-12 e *Streptococcus thermophilus* (cultura ABT), efeito este não observado quando *L. acidophilus* era adicionado em associação apenas com *B. animalis* (OKAZAKI *et al.*, 2001; ALEGRO *et al.*, 2002b).

Observou-se, também, que a viabilidade do microrganismo probiótico era ligeiramente favorecida em queijos adicionados da cultura *starter* tipo O, composta pelos microrganismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, quando comparada à viabilidade em queijos acidificados diretamente com a adição de ácido láctico. Entretanto, esses queijos apresentavam características sensoriais e de textura instrumental mais desfavoráveis, particularmente devido à diminuição excessiva de pH ao final do período de armazenamento. Sugeriu-se, então, que a cultura *starter* tipo O fosse substituída por outra cultura *starter* que resultasse em uma menor pós-acidificação do produto, durante o seu armazenamento refrigerado (BURITI *et al.*, 2005b). Assim sendo, a utilização de uma cepa de *Streptococcus thermophilus* como cultura *starter* poderia contribuir tanto em uma menor acidificação do produto ao longo do seu armazenamento (e, conseqüentemente, melhores características de textura e sensoriais) quanto no estímulo da multiplicação da cepa probiótica La-5 de *L. acidophilus*.

Após a revisão da literatura, nota-se que existem poucos trabalhos explicando o efeito da gordura sobre a sobrevivência de bactérias probióticas. Sendo assim, tornou-se interessante a idéia de estudar o comportamento da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* La-5 em queijo minas frescal com teor reduzido de gordura, para que fosse compreendido o efeito da gordura sobre a viabilidade da bactéria probiótica. Através

desse estudo, poder-se-ia averiguar a possibilidade de, além de se produzir um queijo minas frescal probiótico com populações satisfatórias de *Lactobacillus acidophilus*, produzir este mesmo alimento com características ainda mais saudáveis, como menor teor de gordura.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- ❖ Verificar as populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 em queijo minas frescal processado com a adição desse microrganismo probiótico, associado ou não a uma cultura de *Streptococcus thermophilus*, no produto após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 21 dias;
- ❖ Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental, durante o seu armazenamento;
- ❖ Verificar a influência de um teor reduzido de gordura no produto (queijo *light*) sobre as populações de *L. acidophilus* La-5 em queijo minas frescal, no produto após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 21 dias, na presença ou ausência de *S. thermophilus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fabricação do queijo minas frescal

As principais etapas empregadas na fabricação do queijo minas frescal encontram-se esquematizadas na Figura 1.

Foram produzidos queijos minas frescal a partir de dois tipos de leite, visando a produção de queijos com teor normal e reduzido de gordura, respectivamente:

- Leite tipo B, integral (3,0% de gordura)¹, pasteurizado e homogeneizado, marca comercial Paulista Top (CCL Paulista, São Paulo, Brasil): foram produzidos três tipos de queijos (T1, T2 e T3), todos em triplicata.
- Leite tipo A, *light* (0,4 a 0,5% de gordura)², pasteurizado e homogeneizado, marca comercial Salute (Salute, Descalvado, Brasil): foram produzidos dois tipos de queijos (T2L e T3L), todos em triplicata.

Os tratamentos empregados na fabricação dos queijos, todos com a acidificação direta com ácido láctico são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis empregadas na fabricação do queijo minas frescal.

Queijos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> **	<i>Streptococcus thermophilus</i> ***
T1*	-	-
T2	+	-
T3	+	+

+ = Adição. - = Sem adição.

*T1: sem a adição de cultura (controle).

**Cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* (La-5, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

***Cultura starter: *Streptococcus thermophilus* (TA 040, Danisco, Dangé, França).

Para a acidificação direta do leite utilizado na fabricação os queijos, foram adicionados 2,5 mL de ácido láctico a 85% (grau alimentício; Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brasil), para cada 10 L de leite, previamente diluído em 25 mL de água destilada estéril – diluição (1:10).

^{1,2} valores médios de três repetições.

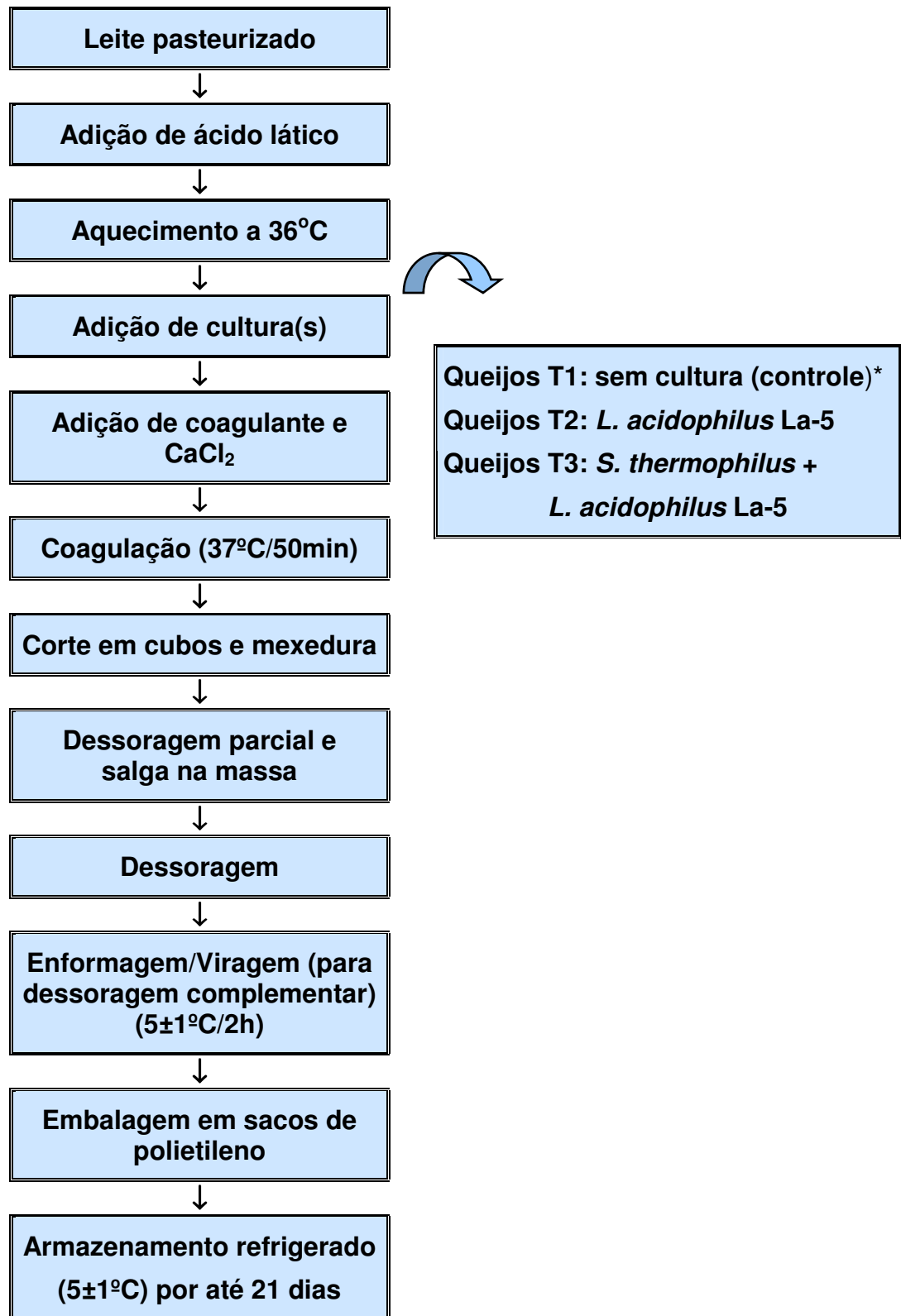


Figura 1. Etapas principais empregadas na fabricação de queijo minas frescal e diferentes tratamentos empregados.

* exceto para queijo minas frescal produzido com leite desnatado.

As culturas utilizadas nos experimentos eram do tipo DVS (*direct set vat* - para a adição direta ao leite durante o processamento) e foram fornecidas pelo fabricante na forma liofilizada e armazenadas congeladas, seguindo as suas orientações. A adição dessas culturas ao leite foi feita de acordo com as instruções do fabricante (1% p/v). Em todos os tratamentos, empregou-se coalho “Ha-la” (88-92% pepsina bovina + 8-12,5% quimosina bovina; Christian Hansen, Valinhos, Brasil), na proporção de 0,5 g/10L de leite, baseado no poder de coagulação a 36°C, tendo sido acrescentado após a adição da(s) cultura(s). Foi realizada uma adição complementar de cloreto de cálcio, adicionando-se 3,0 g/10L de leite, no total. A salga dos queijos foi realizada com a adição de sal (marca comercial Cisne, Cabo Frio, Brasil) ao soro após a dessoragem parcial. A quantidade de sal adicionado equivaleu aproximadamente a 2,0% do peso líquido estimado dos queijos. Durante a dessoragem e o processo de viragem dos produtos (3 vezes, no total), os queijos foram mantidos a 5°C em incubadora B.O.D (Nova Ética, mod. 411D, Vargem Grande Paulista, Brasil). Após o término das viragens, os queijos foram embalados em sacos de polietileno próprios para a embalagem de alimentos (26 × 35 cm), selados em seladora (Enge Vac, São Paulo, Brasil), e armazenados sob refrigeração em cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) a 5±1 °C, por até 21 dias.

3.2. Avaliação do rendimento do processo e determinação da composição centesimal dos queijos

O rendimento de cada processo foi calculado através da determinação da massa de queijo no produto final, obtida para cada 10 litros de leite empregados na produção dos queijos em cada experimento. O rendimento foi expresso em percentagem de gramas de queijo produzidas para 10 L de leite, calculado segundo a fórmula:

$$\left[\frac{\text{massa de queijo obtida na produção (g)}}{\text{volume de leite utilizado na produção (mL)}} \right] \times 100$$

A determinação da composição centesimal dos queijos foi realizada em triplicata, a partir de amostras do 1º dia de armazenamento refrigerado, mantidas congeladas, exceto no caso da determinação da umidade (que foi monitorada durante todo o

período de armazenamento dos queijos e é descrita no item **3.7**). As determinações de gordura (utilizando extrator de Soxhlet) e de proteínas (através do método de Kjeldahl) foram realizadas segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

As determinações do teor de cinzas (a partir de 2 g de amostra) foram realizadas segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). O teor de carboidratos foi calculado por diferença para se obter 100% no total.

As determinações do teor de gordura dos leites integral e desnatado, utilizados na produção dos queijos, foram realizadas utilizando-se butirômetro de Gerber, segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.3. Armazenamento e períodos de amostragem

Durante todo o período de análises do produto, todos os queijos foram armazenados em cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil) a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

As análises para determinações dos parâmetros microbiológicos foram realizadas em duplicata e as análises dos parâmetros físico-químicos, em triplicata. As análises dos parâmetros de textura instrumental foram realizadas com 8 a 10 repetições para cada queijo estudado. As análises descritas foram realizadas no dia seguinte à fabricação (produto final - 1 dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

As análises sensoriais foram realizadas após 7 e 14 dias de fabricação, tendo em vista o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes bioquímicos do queijo que interferem em seu sabor, o período a partir do qual é comercializado em São Paulo e a segurança dos provadores. Assim sendo, a amostragem não incluiu o período de 1 dia, uma vez que em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa constatou que não é possível a distinção entre diferentes queijos minas frescal nos primeiros dias após a sua produção, particularmente pelo fato das culturas atuarem lentamente, do ponto de vista bioquímico (dados não publicados). Aliado a esse fato, o sal ainda não se encontra uniformemente distribuído nos queijos nesse período, o que poderia levar a um resultado heterogêneo para um mesmo tratamento de queijo. Além disso, dificilmente esses produtos chegam antes dos 7 dias após serem produzidos aos estabelecimentos comerciais (ROCHA *et al.*, 2006). O período de 21 dias também foi excluído das análises sensoriais, pelo fato desse período de armazenamento ser considerado

excessivo, uma vez que o aspecto visual do produto é inaceitável para os consumidores, inclusive no caso de queijo minas frescal comercial (BURITI *et al.*, 2005b). Além disso, devido ao período excessivo de armazenamento em se tratando de um queijo fresco, o consumo do produto com 21 dias de armazenamento não ofereceria segurança aos provadores, mesmo em quantidades pequenas para a análise sensorial.

3.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item **3.3**, porções de 25 gramas de queijo (retiradas em condições de assepsia, em fluxo laminar) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando-se o mesmo diluente.

Nos queijos processados com a adição de *Lactobacillus acidophilus* (T2, T3, T2L e T3L) foi realizada a contagem dessa bactéria probiótica, de acordo com as instruções do fabricante da cultura (Christian Hansen). Para este fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) modificado, preparado como meio basal e adicionado de maltose (em substituição à glicose), conforme descrito pelo International Dairy Federation (IDF Standard 306, 1995), fundido e resfriado a cerca de 45°C (**Formulação - ANEXO I**).

Para a contagem de *Streptococcus thermophilus*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar M17 (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY, EUA), adicionado de 50 mL/L de solução estéril de lactose (Oxoid) a 10% (p/v), fundido e resfriado. Após homogeneização e endurecimento do ágar, as placas de ágar MRS modificado e ágar M17 foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas.

Para a contagem de *Staphylococcus* spp., alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar Baird-Parker - BP (base para ágar Baird-Parker, Oxoid, adicionado de 50mL/L de gema de ovo e telurito - suplemento SR054C, Oxoid). A incubação das placas de ágar Baird-Parker - BP foi feita a 37°C por 48 horas (MARSHALL, 1992; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ para *Escherichia coli*, denominadas Petrifilm™ EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a contagem de coliformes totais e de *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. As placas Petrifilm™ EC foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas para determinação de coliformes totais e *E. coli*, respectivamente.

3.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento

Durante a produção dos diferentes tipos de queijo minas frescal, foram realizadas as contagens de *Lactobacillus acidophilus* (para os queijos T2, T3, T2L e T3L), *Streptococcus thermophilus* (para os queijos T3 e T3L), de coliformes totais, de *E. coli* e de *Staphylococcus* spp. (para os queijos T1, T2 e T3), presentes durante o processamento dos queijos (entre a etapa de dessoragem e a de enformagem dos queijos - dia 0) e no produto final (1 dia), conforme descrito no item **3.4**.

3.6. Determinação do perfil de textura instrumental

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item **3.3**, o perfil de textura dos queijos foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras cilíndricas de diâmetro e altura constantes, utilizando placa de alumínio retangular de 10 x 9 cm, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra) (Figura 2). Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram analisados os atributos dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade. Para a realização das análises, os seguintes parâmetros foram empregados: amostras cilíndricas de queijo com altura de 3 cm e diâmetro de 2 cm, distância e velocidade de compressão de 6 mm e de 2,0 mm/s, respectivamente. As amostras, após serem cortadas, foram mantidas refrigeradas a 5±1°C até o momento do teste.



Figura 2. Analisador de Textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra).

3.7. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item **3.3** foram realizadas as determinações de:

- umidade a 70°C, em estufa a vácuo (Marconi MA030112, Piracicaba, Brasil), a partir de 5 g de amostras trituradas;
- acidez livre titulável (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- pH, em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2A04-IF (Analyser, São Paulo, Brasil);
- sinerese, determinada através do cálculo:

$$\left[\frac{\text{quantidade de soro liberada em cada embalagem (g)}}{\text{massa de queijo contida na mesma embalagem (g)}} \right] \times 100$$

3.8. Determinação do Índice de Extensão da Proteólise

O Índice de Extensão da Proteólise (IEP) foi determinado após o 1º e o 21º dia de armazenamento dos queijos a $5\pm 1^\circ\text{C}$, a fim de observar o efeito da adição de culturas *starter* e probiótica nessa proteólise, bem como o aumento entre o início e o fim do armazenamento dos produtos.

3.8.1. Determinação de nitrogênio total

A determinação de nitrogênio total foi realizada através de um processo de extração em solução de citrato de sódio, com posterior quantificação pelo tradicional método de micro-Kjeldahl. A extração foi realizada, pesando-se 10,0 g da amostra bem homogeneizada, uma vez que a quantidade de proteína, a taxa e o tipo de hidrólise da caseína podem variar dentro de uma mesma peça de queijo (SOUSA *et al.*, 2001). Após a homogeneização e pesagem, adicionou-se à amostra 80 mL de água destilada a $40-45^\circ\text{C}$ e 40 mL de solução de acetato de sódio 0,5 mol/L. Essa suspensão foi, então, triturada em processador por 7 minutos e, em seguida, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 200 mL. O volume foi completado com água destilada (BALDINI, 1998).

Após a extração, 5 mL da amostra foram transferidos para um tubo de Kjeldahl de 100 mL, onde se acrescentou 0,0675g de sulfato de cobre PA, 2g de sulfato de potássio e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Este tubo foi, então, colocado no digestor por aproximadamente 12 horas, a fim de assegurar a completa digestão da amostra. O tempo de digestão foi bem extenso, devido à grande umidade da amostra. Sendo assim, a elevação da temperatura de digestão deve ser lenta e gradual. Finalizada a digestão, acrescentou-se à amostra 10 mL de água destilada e acoplou-se o tubo ao aparelho de destilação de Kjeldahl. Inicialmente, reagiu-se a amostra com 15 mL de NaOH a 40%, para haver formação de NH_4OH . Tal composto foi, então, destilado por arraste a vapor e recolhido em um Erlenmayer contendo 5 mL de ácido bórico e 4 gotas de reagente de Kjeldahl. Finalizada a destilação, o conteúdo do Erlenmayer foi titulado com HCl 0,02N, a fim de quantificar o conteúdo de compostos nitrogenados presentes na amostra.

3.8.2. Determinação de nitrogênio solúvel

A determinação de nitrogênio solúvel em solução tampão pH 4,6 foi realizada utilizando-se 100 mL da emulsão obtida ao fim do processo de extração, descrito no item anterior. Esses 100 mL foram acidificados até pH 4,6, utilizando-se solução de ácido clorídrico 1,41 M. O procedimento utilizado recomenda o uso de 10 mL para que se acidifique a amostra até pH 4,6. Porém, verificou-se que 8,0-8,5 mL foram suficientes para se atingir esse pH. Após a acidificação, a mistura obtida foi filtrada em papel Whatman nº 1 e, assim como na determinação do nitrogênio total, utilizou-se 5 mL do filtrado para serem quantificados através da metodologia de micro-Kjeldahl, descrita no item 3.8.1. A titulação foi feita com HCl 0,01 N.

3.8.3. Cálculo do índice de extensão da proteólise

O índice de extensão da proteólise (IEP) é dado pela percentagem de nitrogênio solúvel, em relação ao total de nitrogênio (SOUSA *et al.*, 2001), calculado através da fórmula proposta por SCHIMIDT-HEBBEL (1956), utilizada por ISEPON (1999):

$$\text{I.E.P} = \left[\frac{\text{nitrogênio solúvel}}{\text{nitrogênio total}} \right] \times 100$$

3.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema fatorial 3x4, constituído de 3 tipos de combinações em termos de culturas adicionadas (ou não) durante a produção dos queijos (sem adição de culturas, adição de *Lactobacillus acidophilus*, adição de *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus*) e 4 tempos (1, 7, 14 e 21 dias após o processamento), com 3 repetições (GOMES, 1987; BARROS NETO *et al.*, 2001).

A comparação dos resultados entre os diferentes queijos estudados para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo foi feita através de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa

Excel versão 2000 (Microsoft Corporation, USA) e teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

3.10. Análise sensorial

Conforme descrito e justificado anteriormente, a análise sensorial foi conduzida após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, para a comparação sensorial dos três tipos de queijos minas frescal produzidos com leite integral, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (**ANEXO II - Protocolo nº067/2004**). A referida análise sensorial foi conduzida segundo o delineamento de ordenação em blocos casualizados, com 30 provadores não treinados (consumidores) em cada etapa da análise, empregando-se teste de aceitabilidade, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (ou 9 pontos) a desgostei muitíssimo (ou 1 ponto) (LAWLESS & HEYMANN, 1999) (**Modelo de ficha – ANEXO III**). Esse grupo de provadores foi constituído por professores, alunos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e de outras unidades da USP, selecionados com base em hábitos de consumo regular de queijo minas frescal. As amostras de queijo (aproximadamente 25 g), servidas aos provadores em pratos plásticos brancos, foram codificadas com números aleatórios de três dígitos. As amostras foram oferecidas aos provadores monadicamente. Os provadores foram instruídos a avaliar os queijos quanto à aceitabilidade global, utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = não gostei nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

A comparação dos dados obtidos em cada etapa da análise sensorial (7 e 14 dias) para os três tipos de queijos produzidos foi realizada via teste não paramétrico de Friedman, seguido de comparação múltipla (FERREIRA, 2000). A comparação dos dados obtidos para cada queijo, ao longo do armazenamento, foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney – Teste U (O'MAHONY, 1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal

A Tabela 2 apresenta os valores da composição centesimal dos queijos produzidos com leite integral, realizada com amostras de queijos com 1 dia de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, mantidas congeladas até o momento das análises.

Não foram detectadas diferenças significativas entre T1, T2 e T3 para os valores de gordura, proteínas, cinzas e carboidratos totais encontrados. Os valores encontrados são próximos dos obtidos por BURITI *et al.* (2005b).

A composição química do leite é obviamente influenciada por fatores como estação do ano e clima, além da alimentação, idade, estágio de lactação e saúde dos animais (FARKYE, 2004). Tal fato pode explicar os valores de proteína um pouco menores encontrados para T3, uma vez que não foi possível utilizar o mesmo lote de leite para todas as produções dos queijos estudados.

Tabela 2. Composição centesimal e umidade (média \pm desvio - padrão) obtidos para os queijos T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), no produto final (matéria úmida) - após 1 dia de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Queijos	Umidade* (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)
T1	66,33 \pm 0,34	15,66 \pm 0,14	12,87 \pm 0,75	2,35 \pm 0,24	2,80 \pm 0,27
T2	65,57 \pm 0,90	16,22 \pm 0,11	10,04 \pm 0,60	2,43 \pm 0,06	5,74 \pm 0,63
T3	64,63 \pm 0,46	16,20 \pm 0,90	9,44 \pm 0,59	2,02 \pm 0,31	7,71 \pm 1,27

* Os valores desta tabela são valores médios de umidade obtidos em triplicata para as amostras dos queijos utilizados para realização das análises de composição centesimal.

4.2. Parâmetros físico-químicos

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos nas análises físico-químicas, realizadas durante o armazenamento refrigerado dos queijos produzidos com leite integral.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), no produto final (1dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^\circ\text{C}$.

Queijos	Tempo (Dias)	pH	Acidez titulável (mL/100g)*	Umidade (%)	Sinerese (%)
T1	1	6,58 \pm 0,10 ^{Aa}	0,18 \pm 0,04 ^{Aa}	67,01 \pm 1,33 ^{Aa}	3,98 \pm 1,59 ^{Aa}
	7	6,50 \pm 0,15 ^{Aa}	0,19 \pm 0,05 ^{Aa}	65,42 \pm 1,63 ^{Ab}	12,44 \pm 2,42 ^{Ab}
	14	6,36 \pm 0,29 ^{Aa}	0,22 \pm 0,09 ^{Aab}	63,08 \pm 1,12 ^{Ac}	16,39 \pm 2,84 ^{Abc}
	21	6,34 \pm 0,12 ^{Aa}	0,29 \pm 0,07 ^{Ab}	62,82 \pm 0,65 ^{Ac}	19,6 \pm 3,68 ^{Ac}
T2	1	6,66 \pm 0,08 ^{Aa}	0,17 \pm 0,02 ^{Aa}	66,64 \pm 1,41 ^{ABa}	2,38 \pm 1,58 ^{Aa}
	7	6,53 \pm 0,05 ^{Ab}	0,17 \pm 0,04 ^{Aab}	64,44 \pm 1,49 ^{Ab}	8,87 \pm 1,78 ^{Ab}
	14	6,42 \pm 0,01 ^{Ac}	0,21 \pm 0,05 ^{Ab}	63,60 \pm 1,58 ^{Ab}	13,11 \pm 4,09 ^{Abc}
	21	6,41 \pm 0,14 ^{Abc}	0,28 \pm 0,03 ^{Ac}	63,37 \pm 2,65 ^{Ab}	15,87 \pm 2,65 ^{Ac}
T3	1	6,49 \pm 0,20 ^{Aa}	0,19 \pm 0,04 ^{Aa}	65,50 \pm 1,23 ^{Ba}	2,94 \pm 1,19 ^{Aa}
	7	6,38 \pm 0,31 ^{Aab}	0,25 \pm 0,09 ^{Bab}	64,70 \pm 0,83 ^{Aab}	7,49 \pm 3,06 ^{Aab}
	14	6,17 \pm 0,23 ^{Abc}	0,30 \pm 0,06 ^{Bb}	62,04 \pm 0,69 ^{Bb}	11,38 \pm 4,23 ^{Abc}
	21	6,02 \pm 0,12 ^{Bc}	0,38 \pm 0,05 ^{Bc}	61,90 \pm 1,91 ^{Ab}	12,69 \pm 0,76 ^{Ac}

* mL de ácido láctico/100 gramas de produto.

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

O ácido láctico é o principal produto do metabolismo das bactérias lácticas (cerca de 70 a 90% dos compostos gerados) e é sintetizado durante todo o processo de maturação dos queijos, a partir da fermentação da lactose (SALMINEN & VON WRIGHT, 1993). A produção de ácidos pelas bactérias adicionadas aos queijos T2 e T3 no presente trabalho garantiu a queda nos valores de pH durante todo o armazenamento dos produtos, com conseqüente aumento da acidez. Semelhantemente, estudos conduzidos por MACEDO *et al.* (2004) com queijo serra-da-estrela adicionados de cepas de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*, revelaram queijos que apresentaram decréscimo nos valores de pH durante o

armazenamento, levando a baixos valores de pH (4,74) ao final do armazenamento dos produtos, porém, aceitável para esse tipo de queijo.

O queijo controle (T1) também apresentou queda nos valores de pH, embora essa diminuição não tenha sido significativa ($p > 0,05$). A presença de culturas nos queijos T2 e T3 assegurou a diminuição do pH, devido à constante produção de ácidos. Apenas os queijos T2 e T3 apresentaram diminuição significativa no pH, sendo que ao 21º dia, T3 diferiu significativamente de T2 ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser explicada, devido à presença, além da cultura probiótica, da cultura *starter*, que contribuiu para a maior acidificação dos queijos T3. Tal fato ocorreu devido à liberação de ácidos orgânicos produzidos pela cultura de *Streptococcus thermophilus*, principalmente ácido láctico, produzido a partir da fermentação da lactose, levando à acidificação do produto (FOX *et al.*, 2000; ZISU & SHAH, 2003). A maior acidez encontrada ao 21º dia de armazenamento para os queijos T3 foi decorrente da constante produção de ácidos, também chamada de pós-acidificação (GARDINI *et al.*, 1999). Foi decorrente, também, do acúmulo desses ácidos desde o início do armazenamento dos produtos, provenientes do metabolismo das bactérias presentes, principalmente das populações de *S. thermophilus*, que se mantiveram viáveis atingindo concentrações próximas de 8 log UFC/g durante todo o armazenamento. Tal comportamento também explica o fato de que, embora a acidez livre tenha aumentado para todos os queijos estudados, apenas foi detectada diferença significativa entre T3 e os demais queijos a partir do 7º dia de armazenamento dos produtos ($p < 0,05$).

O queijo T1 também apresentou aumento progressivo nos valores de acidez, mesmo sem a adição de culturas durante a produção dos queijos; ao 21º dia, apresentou acidez significativamente maior que os valores obtidos ao 1º e ao 7º dia de armazenamento ($p < 0,05$). Tal fato pode ser atribuído à presença de altas populações de *Staphylococcus* spp. Tal contaminante altera a concentração de ácidos orgânicos no meio, uma vez que a partir da fermentação de diversos açúcares, incluindo glicose e lactose, produz ácidos que se acumulam no queijo (FOX *et al.*, 2000).

O aumento na acidez com concomitante queda nos valores de pH de queijos é comumente observado em pesquisas realizadas com esse tipo de produto. A acidez aumenta devido à produção de ácidos orgânicos, sendo o ácido láctico o primeiro a ser sintetizado (GONCU & ALPKENT, 2005).

A relação obtida entre o pH e a acidez dos queijos T1, T2 e T3 foi semelhante aos resultados obtidos por GONCU & ALPKENT (2005), em pesquisa realizada com queijo branco, que apresentou diminuição significativa do pH ao longo do armazenamento.

Todos os queijos apresentaram queda significativa nos valores de umidade ($p < 0,05$), concomitante ao aumento na liberação de soro (sinerese) ao longo do armazenamento refrigerado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. A sinerese é a expulsão do soro do coágulo, causada pela sua contração devido ao rearranjo entre os agregados de proteína (GRUNDELIUS *et al.*, 2000). Durante a fabricação do queijo minas frescal neste trabalho, a sinerese foi induzida através de agitação da massa coalhada, após ter sido cortada em cubos, para a obtenção de uma massa consistente de queijo, para posterior enformagem. Além disso, durante o armazenamento, o processo de sinerese continuou ocorrendo, devido às modificações bioquímicas que ocorrem durante a maturação dos queijos. Os valores de sinerese encontrados para todos os queijos estudados estavam diretamente relacionados aos valores de acidez e, portanto, inversamente ao pH, como descrito por FOX *et al.* (2000).

Com a contínua acidificação dos produtos, as concentrações de íons H^+ nos queijos aumentam. Desta forma, em produtos com baixa concentração de sal, como o queijo minas frescal, as forças repulsivas existentes entre as micelas de caseínas diminuem, provocando a sua agregação, promovendo a expulsão do soro e, conseqüentemente, aumentando a sinerese (Figura 3) (SCHKODA *et al.*, 1999; FOX *et al.*, 2000). Uma vez agregadas, as micelas não dispersam novamente, quando o produto é armazenado sob baixas temperaturas (WALSTRA, 1990).

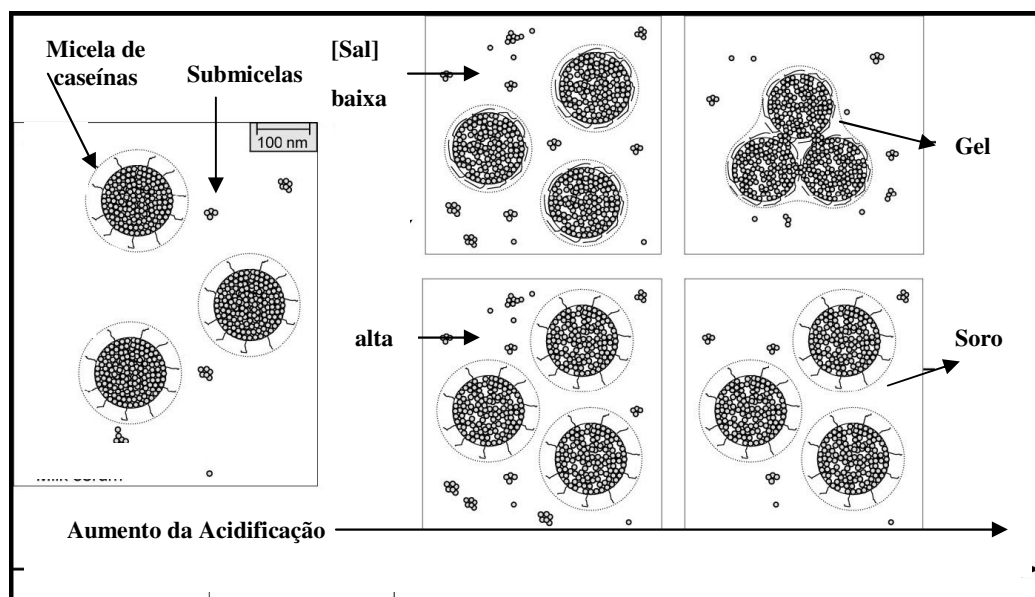


Figura 3. Efeito da acidificação na agregação das micelas de caseínas e na expulsão do soro (Adaptada de SCHKODA *et al.*, 1999).

Em todos os queijos estudados, a diminuição do pH promoveu uma maior liberação do soro ao longo do armazenamento ($p < 0,05$). Paralelamente, o teor de umidade diminuiu significativamente para todos os queijos estudados, durante o armazenamento ($p < 0,05$). Entretanto, a diminuição da umidade não foi estatisticamente significativa para T2 e T3 após o 7º dia de armazenamento. O queijo controle apresentou queda significativa na umidade entre o 1º e o 14º dia ($p < 0,05$). Tal fato está associado ao aumento concomitante da sinerese, em virtude do aumento das interações iônicas entre as micelas de caseína. A diminuição da umidade dos queijos refletiu-se no aumento da sua dureza, assim como nos parâmetros derivados da dureza (gomosidade e mastigabilidade).

Em estudos com queijos minas frescal adicionados de culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, ambos adicionados de ácido láctico, realizados por BURITI *et al.* (2005b) e BURITI *et al.* (2005a), respectivamente, foi observada diminuição na umidade ao longo do armazenamento refrigerado e aumento na dureza. No presente trabalho, os queijos T1, T2 e T3 apresentaram, respectivamente, uma queda aproximada de 4,19%, 3,27% e 3,60% no teor de umidade, durante o período de armazenamento do produto. Os queijos T1 apresentaram maiores percentagens de umidade quando comparados aos T3, porém, esta diferença foi significativa apenas ao 1º e ao 14º dia de armazenamento. Ao 14º dia

de armazenamento, T3 apresentou valores de acidez significativamente maiores que os valores encontrados para T1, resultando em valores de umidade significativamente menores para T3 ($p < 0,05$), embora os valores de sinerese não tenham diferido estatisticamente de T1 ($p > 0,05$).

4.3. Rendimento das produções

Existem dois tipos de rendimento: o chamado rendimento econômico, que se refere à quantidade de massa de queijo produzida em relação ao volume de leite utilizado na produção, e o rendimento técnico, que se refere ao aproveitamento dos constituintes do leite que são transferidos ao queijo, ou seja, o aproveitamento de elementos como a gordura, proteínas, totais (ou somente caseína), extrato seco total desengordurado, entre outros (ALEGRO, 2003). Neste trabalho, utilizou-se o rendimento denominado econômico, segundo a definição acima, para avaliar os queijos estudados.

A Figura 4 apresenta os valores médios dos rendimentos obtidos para as três produções realizadas com leite integral para os queijos T1, T2 e T3. O queijo T1 apresentou rendimento médio ligeiramente maior (23,74%), seguido de T2 e T3, com 22,17 e 21,46% respectivamente. Algumas indústrias têm substituído a adição de culturas *starter* pela adição de ácido láctico, para a obtenção de queijos com melhores rendimentos e textura. Entretanto, o uso da acidificação direta resulta em queijos com maiores valores de pH e de umidade, tornando-os mais susceptíveis à deterioração por microrganismos patogênicos (CUNHA *et al.*, 2006).

BURITI *et al.* (2005b), em pesquisa realizada com queijo minas frescal, obtiveram rendimentos significativamente maiores para queijos que foram acidificados diretamente com ácido láctico, em detrimento dos queijos adicionados de cultura tipo O. No presente trabalho, a análise estatística não apontou diferença significativa entre os valores de rendimento obtidos para os queijos T1, T2 e T3.

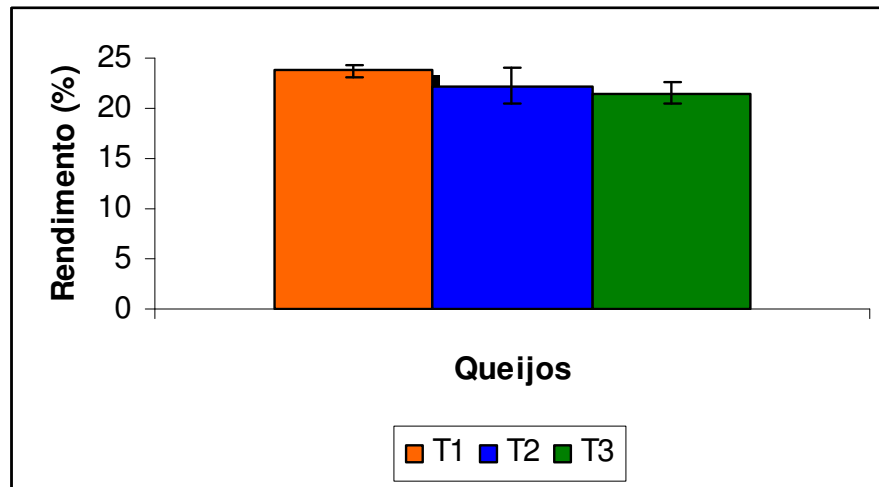


Figura 4. Valores do rendimento médio obtido a partir de 3 produções de cada queijo estudado: T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*).

Em estudo realizado com queijo minas frescal tradicional, NEVES-SOUZA & SILVA (2005) obtiveram rendimentos relativamente menores que os encontrados neste trabalho, com queijos adicionados tanto de coalho bovino (16,67%) como de coagulante de origem microbiana (16,54%). No presente trabalho, o leite utilizado nas produções dos queijos foi previamente homogeneizado, o que provavelmente auxiliou na obtenção de maiores rendimentos. O processo de homogeneização do leite reduz o tamanho dos glóbulos de gordura, que tornam-se revestidos por uma camada que consiste de caseínas, micelas de caseínas e outras proteínas do soro. Esses novos glóbulos de gordura formados atuam como partículas de pseudo-caseínas, uma vez que tornam-se parte da rede de caseína formada pela ação do coagulante empregado na fabricação do queijo. Tal procedimento leva à obtenção de queijos com maiores teores de umidade e menores perdas de gordura no soro, o que aumenta o rendimento das produções (FOX *et al.*, 2000).

Além de um maior rendimento, a homogeneização torna a gordura mais suscetível à ação das lipases, uma vez que ocorre a ruptura mecânica dos glóbulos de gordura durante o processo, facilitando a formação de ácidos graxos livres, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta butírico, capróico, caprílico e cáprico, que são precursores de alguns dos constituintes fundamentais para o desenvolvimento do

flavour em queijos, como metil-cetonas, álcoois lactonas e ésteres (HOIER *et al.*, 1999; PERRY, 2004; YILMAZ *et al.*, 2005; FONTECHA *et al.*, 2006).

4.4. Parâmetros microbiológicos

4.4.1. Viabilidade da bactéria probiótica

A Tabela 4 apresenta as populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média e variação) observadas para os queijos T2 e T3.

Tabela 4. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média e variação) obtidas para os queijos T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)				
Queijos				
	T2		T3	
Tempo (Dias)	Média	Variação*	Média	Variação*
0	6,16 \pm 0,07 ^{Aa}	6,05 – 6,27	6,01 \pm 0,27 ^{Aab}	5,09 – 6,30
1	6,08 \pm 0,27 ^{Aa}	5,62 – 6,27	5,74 \pm 0,22 ^{Aa}	5,30 – 5,97
7	6,00 \pm 0,26 ^{Aa}	5,50 – 6,17	6,22 \pm 0,49 ^{Aab}	5,44 – 6,47
14	7,04 \pm 0,93 ^{Aa}	5,27 – 7,66	6,23 \pm 0,37 ^{Ab}	5,67 – 6,63
21	6,30 \pm 0,45 ^{Aa}	5,54 – 6,85	6,57 \pm 0,45 ^{Ab}	5,83 – 6,81

* Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

Para que um alimento probiótico exerça seus efeitos benéficos, é recomendado que ele apresente uma concentração mínima da bactéria probiótica dentro do prazo de validade do produto (BRASIL, 1999). 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 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE & SALMINEN, 1995; BLANCHETTE, 1996; HOIER *et al.*, 1999). No presente trabalho, todos os queijos produzidos com a adição de cultura probiótica de *Lactobacillus*

acidophilus La-5 (T2, T3, T2L e T3L) revelaram populações suficientes para caracterizá-los como potencialmente probióticos. Os queijos produzidos com leite integral apresentaram populações que variaram de 6,16 a 6,30 log UFC/g e de 6,01 a 6,57 log UFC/g para T2 e T3 respectivamente. Por outro lado, T2L e T3L apresentaram populações superiores, tendo variado, respectivamente, de 6,20 a 7,70 log UFC/g e de 6,76 a 7,92 log UFC/g, entre o processamento (dia 0) e o 21º dia de armazenamento refrigerado a $5\pm 1^\circ\text{C}$.

Em estudo realizado com queijo minas fescal, BURITI *et al.* (2005b) observaram populações de *L. acidophilus* variando entre 6,31 e 6,10 log UFC/g entre a produção e o 21º dia de armazenamento refrigerado, respectivamente, quando *L. acidophilus* foi incorporado isoladamente ao queijo. Quando *L. acidophilus* foi adicionado em co-cultura com cultura tipo O, as populações variaram entre 6,28 e 6,66 log UFC/g durante o armazenamento.

KASIMOĞLU *et al.* (2004), obtiveram populações elevadas de *L. acidophilus* em queijos brancos; produzidos de duas formas: com e sem o processo de salga, atingindo, respectivamente, populações de 10^9 e 10^{10} UFC/g ao 7º dia de armazenamento. Após 7 dias, as populações decresceram, devido à queda nos níveis de umidade e aumento na concentração de sal. Entretanto, ambos os queijos continuaram com populações de 10^7 e 10^6 UFC/g, respectivamente. Em contrapartida, GOMES & MALCATA (1998) estudaram a incorporação de *L. acidophilus* em queijo semi-duro e concluíram que as populações de *L. acidophilus* não atingem valores superiores a $6,0 \times 10^7$ UFC/g nesse tipo de produto.

Semelhantemente aos queijos produzidos no presente trabalho, BERGAMINI *et al.* (2005), em estudo com queijo argentino semi-duro, obtiveram populações de *L. acidophilus* de 10^6 UFC/g, quando as culturas foram adicionadas diretamente ao leite, na forma liofilizada.

VINDEROLA *et al.* (2000b) obtiveram populações de *L. acidophilus* acima de 10^6 UFC/g em queijo fresco argentino, durante o período de estocagem, quando a cultura foi adicionada juntamente com bifidobactérias, embora algumas combinações de culturas apresentaram um decréscimo em sua viabilidade. Quando adicionada em co-cultura com *B. bifidum* e *L. casei*, as maiores populações de *L. acidophilus* foram atingidas, chegando a 8,56 log UFC/g ao término do armazenamento.

Além de diversos tipos de queijos, outros produtos, como sorvetes, *frozen yogurt* e sobremesas lácteas, também apresentaram-se como bons veículos para a incorporação de *Lactobacillus acidophilus*, que atingiram populações entre 10^6 e 10^8 UFC/g ou mL (GARDINER *et al.*, 1999). Em estudo realizado com iogurtes, ITURRIRIA *et al.* (1999) reportaram populações satisfatórias de *L. acidophilus* durante 52 dias de armazenamento, embora tenham detectado pequena queda na viabilidade, de $1,2 \times 10^7$ para $8,7 \times 10^6$ UFC/g.

MARUYAMA *et al.* (2006) observaram populações de *L. acidophilus* superiores a 6 log UFC/g ao longo do armazenamento refrigerado, quando o probiótico foi incorporado a queijo tipo *petit suisse*. Além disso, constataram que a viabilidade de *L. acidophilus* não sofreu influência da redução do pH durante o armazenamento, embora o produto tenha atingido valores de pH abaixo dos valores ótimos para a multiplicação desse microrganismo.

Em pesquisa realizada com leite não fermentado, FIGUEIREDO *et al.* (2004) testaram a adição de *L. acidophilus* ao produto em 3 concentrações diferentes (10^5 , 10^6 e 10^8 UFC/g), que foi armazenado em quatro temperaturas diferentes: 6, 8, 10 e 12°C. Os autores verificaram que, quando os produtos foram armazenados a temperaturas de 6 e 8°C, as células mantiveram-se em números estáveis, não havendo diminuição nas populações até o 14º dia de armazenamento. A concentração de 10^8 UFC/g foi considerada inadequada pelos pesquisadores, devido à maior produção de ácidos, o que reduziu muito o pH dos produtos, alterando o sabor dos leites não fermentados já a partir do 2º dia de armazenamento.

No presente trabalho, o queijo T3 (adicionado de *L. acidophilus* e *S. thermophilus*) apresentou populações de *L. acidophilus* acima de 6,00 log UFC/g durante a produção (dia 0) e a partir do 7º dia de armazenamento, atingindo 6,57 log UFC/g ao 21º dia de armazenamento. Ao 1º dia de armazenamento, uma pequena queda nessas populações foi observada (0,26 log UFC/g), que pode estar associada ao pH, que apresentou-se menor no queijo T3, embora não tenha diferido significativamente de T2 ($p > 0,05$).

O fato da bactéria probiótica ter apresentado populações abaixo do nível recomendado no 1º dia de armazenamento no queijo T3, pode ser explicado pela pós-acidificação, causada pela bactéria *starter* empregada neste trabalho. A pós-acidificação é apontada como umas das causas da perda de viabilidade de bactérias

probióticas. As bactérias *starter* empregadas na fabricação de iogurtes (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) multiplicam-se mais rapidamente que as bactérias probióticas durante a fermentação, com conseqüente produção de compostos inibitórios, como ácidos e H_2O_2 . Essas substâncias são responsáveis pela baixa sobrevivência e perda da viabilidade de microrganismos probióticos, como *L. acidophilus* e bifidobactérias (SHAH, 2000). Entretanto, o fato de, ao 1º dia de armazenamento, as populações de *L. acidophilus* observadas apresentarem populações abaixo do mínimo recomendado para que um produto alimentício seja caracterizado como probiótico, não exclui a característica probiótica de T3, uma vez que logo após a produção e embalagem, os queijos ainda não apresentam características organolépticas ideais para o consumo. O queijo é um sistema químico, microbiológico e enzimaticamente complexo e dinâmico: as características de sabor e textura dos queijos são desenvolvidas durante um período de maturação, através de atividades lipolíticas e proteolíticas das bactérias neles presentes (BOYLSTON *et al.*, 2004). Apesar do queijo minas frescal não se tratar de um queijo maturado, esse produto necessita de alguns dias para atingir propriedades mais estáveis, ou seja, após sua fabricação ainda ocorrem algumas modificações nesse produto, de maneira que após essas transformações, o queijo minas frescal apresenta as suas características organolépticas típicas.

Diversas reações bioquímicas, como lipólise, proteólise, fermentação da lactose e formação de compostos voláteis ainda ocorrem no interior do queijo e se refletem no equilíbrio dos componentes bioquímicos que interferem em seu sabor. Essas reações, depois de completadas, conferem ao produto as características inerentes a ele. Essas características advêm dos componentes principais do substrato, que consistem principalmente de caseínas, gorduras e carboidratos, e da grande variedade de agentes envolvidos nas transformações bioquímicas dos queijos (KHALID & MARTH, 1990). Além disso, embora seja considerado um queijo fresco, o queijo minas frescal dificilmente é encontrado nos pontos de venda logo após a sua fabricação. ROCHA *et al.* (2006) verificaram que os queijos minas frescal disponíveis para comercialização na cidade de São Paulo já chegavam aos supermercados com datas avançadas, quando comparadas às datas de fabricação. Sendo assim, o produto comercializado ainda não está disponível para o consumidor logo no primeiro dia após sua fabricação.

Conforme mencionado anteriormente, o critério estabelecido pela ANVISA referente à quantidade mínima diária de microrganismos viáveis que devem ser

ingeridos para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC (ANVISA, 2006). Sendo assim, pode-se sugerir que a ingestão diária de 100 g dos queijos T2 e T3 desenvolvidos no presente trabalho é suficiente para resultar em efeitos probióticos.

A Tabela 5 apresenta as populações de *L. acidophilus* La-5 (média e variação) observadas para os queijos T2L e T3L.

Tabela 5. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média e variação) obtidas para os queijos T2L (adição de *L. acidophilus*) e T3L (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), produzidos com leite desnatado, durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)				
Queijos				
	T2L		T3L	
Tempo (Dias)	Média	Variação*	Média	Variação*
0	6,20±0,31 ^{Aa}	5,57 – 6,34	6,76±0,57 ^{Aa}	5,81 – 7,10
1	6,23±0,19 ^{Aa}	6,00 – 6,46	6,71±0,48 ^{Aa}	5,91 – 6,96
7	7,48±0,17 ^{Ab}	7,17 – 7,59	7,27±0,34 ^{Ab}	6,97 – 7,85
14	7,53±0,13 ^{Ab}	7,40 – 7,70	7,54±0,23 ^{Ab}	7,23 – 7,68
21	7,70±0,35 ^{Ab}	7,21 – 7,98	7,92±0,06 ^{Ac}	7,85 – 7,99

* Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

No presente trabalho, o teor de gordura reduzido dos queijos (aproximadamente 4,65% de gordura em base úmida) não impediu a multiplicação do probiótico durante todo o armazenamento dos queijos T2L e T3L a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, uma vez que as populações observadas nesses queijos foram suficientes para caracterizá-los como um alimento probiótico. Possivelmente, as elevadas populações encontradas para *L. acidophilus* nos queijos T2L e T3L podem estar relacionadas ao maior teor de umidade desses queijos. DRAKE & SWANSON (1995) relataram que queijos produzidos com teor reduzido de gordura apresentam alta umidade, o que pode auxiliar na multiplicação de bactérias lácticas.

Semelhantemente, em estudo realizado com queijo festivo, RYHÄNEN *et al.* (2001), obtiveram populações satisfatórias de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, quando essas cepas probióticas foram incorporadas em queijos contendo teor de gordura reduzido (aproximadamente 11%). *B. lactis* apresentou elevadas populações, embora durante a maturação, os autores tenham observado uma redução nas populações desse microrganismo. No mesmo estudo, embora *L. acidophilus* tenha apresentado decréscimo em aproximadamente 1 log UFC/g, o produto permaneceu com populações de 6,48 log UFC/g ao término do armazenamento de 16 semanas.

Da mesma forma, em estudo realizado com iogurte fermentado contendo reduzido teor de gordura (4%), DAVIDSON *et al.* (2000), obtiveram populações satisfatórias de *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus* para um efeito terapêutico.

THAGE *et al.* (2005) estudaram o efeito da incorporação de diferentes cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (CHCC 2115, 4256 e 5583) em queijo semi-duro, com teor reduzido de gordura (30% em matéria seca), na formação de compostos voláteis. Embora o foco principal do trabalho não tenha sido a sobrevivência dos microrganismos, as populações encontradas no produto foram de aproximadamente 8,4 log UFC/g, satisfatórias para um alimento probiótico.

HAYNES *et al.* (2002) estudaram o efeito da adição de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus paracasei* a sorvetes produzidos com duas concentrações diferentes de gordura. Os autores relataram que o produto contendo maior concentração de gordura não ofereceu melhores condições para a multiplicação das cepas, quando comparado ao produto contendo menor teor de gordura, que apresentou uma maior taxa de sobrevivência das três cepas durante o processo de congelamento, permanecendo com populações de $1,0 \times 10^6$ UFC/g durante 52 dias de armazenamento.

ALAMPRESE *et al.* (2002) reportaram a incorporação de *Lactobacillus johnsonii* La-1 em diferentes formulações de sorvetes, variando os teores de gordura (5 e 10%) e açúcar (15 e 22%) dos produtos. Em todas as formulações testadas, os autores não observaram quedas significativas nas contagens do microrganismo, que permaneceu com populações de 10^7 UFC/g durante o armazenamento refrigerado por até 8 meses. Quando as mesmas condições foram testadas utilizando-se a cepa *Lactobacillus*

rhamnosus GG, ALAMPRESE *et al.* (2005) verificaram que a cepa permaneceu viável, com populações de 10^8 UFC/g durante o armazenamento por até 1 ano.

VINDEROLA *et al.* (2000a) estudaram a produção de iogurtes produzidos com alto e baixo teor de gordura adicionados de culturas probióticas (*Bifidobacterium bifidum* BBI e *Lactobacillus acidophilus* La-1) e culturas *starter* (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Nos dois tipos de iogurtes estudados, ocorreram quedas na viabilidade das bactérias probióticas empregadas. Porém, a queda maior ocorreu com *Bifidobacterium bifidum* BBI no iogurte com maior teor de gordura, quando a cultura *starter* foi inoculada indiretamente. *Lactobacillus acidophilus* manteve-se mais estável, com variações mínimas entre as populações observadas no iogurte com alto e baixo teor de gordura. Esse estudo mostrou que iogurtes com alta concentração de gordura parecem ser mais inibitórios para culturas probióticas do que outros tipos de iogurtes, principalmente para culturas de *Bifidobacterium bifidum* BBI. Tal fato foi observado no presente trabalho, uma vez que as populações de *L. acidophilus* observadas nos queijos com menor teor de gordura foram superiores às populações encontradas nos demais queijos ainda durante a produção (dia 0) e no 1º dia de armazenamento refrigerado ($p < 0,05$), embora todos os queijos tenham apresentado populações satisfatórias para um alimento probiótico. A análise estatística apontou um aumento significativo nas populações de *L. acidophilus* nos queijos T2L e T3L, a partir do 7º e 1º dia de armazenamento, respectivamente, quando foram comparados a T2 e T3 no mesmo período (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média) obtidas para os queijos T2 e T2L (adição de *L. acidophilus*) produzidos com leite integral (T2) e desnatado (T2L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)		
Queijos		
	T2	T2L
Tempo (Dias)	Média	
0	6,16±0,07 ^{Aa}	6,20±0,31 ^{Aa}
1	6,08±0,27 ^{Aa}	6,23±0,19 ^{Aa}
7	6,00±0,26 ^{Aa}	7,48±0,17 ^{Bb}
14	7,04±0,93 ^{Aa}	7,53±0,13 ^{Bb}
21	6,30±0,45 ^{Aa}	7,70±0,35 ^{Bb}

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

Tabela 7. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média) obtidas para os queijos T3 e T3L (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*) produzidos com leite integral (T3) e desnatado (T3L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)		
Queijos		
	T3	T3L
Tempo (Dias)	Média	
0	6,01±0,27 ^{Aab}	6,76±0,57 ^{Aa}
1	5,74±0,22 ^{Aa}	6,71±0,48 ^{Ba}
7	6,22±0,49 ^{Aab}	7,27±0,34 ^{Bb}
14	6,23±0,37 ^{Ab}	7,54±0,23 ^{Bb}
21	6,57±0,45 ^{Ab}	7,92±0,06 ^{Bc}

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

A preocupação dos consumidores em relação aos efeitos prejudiciais da ingestão de uma dieta rica em gordura tem aumentado e, desta forma, a procura por produtos com baixas concentrações de gordura (ou produtos *light*), principalmente os queijos, aumentaram substancialmente, sobretudo após a década de 80 (JOHNSON & LAW, 1999; BANKS, 2004).

Os queijos com baixo teor de gordura caracterizam-se por apresentarem rendimento menor, textura mais dura e problemas de acidez e sabor amargo, quando comparados aos queijos tradicionais (CUNHA *et al.*, 2006). Os rendimentos obtidos para T2L e T3L, no presente trabalho, foram de 15,58 e 15,60%, respectivamente. Esses valores encontrados foram bem menores, quando comparados aos valores de rendimentos obtidos para os queijos produzidos com leite integral - 22,17 e 21,46%, respectivamente. Tal fato já era esperado, uma vez que queijos produzidos com leite desnatado apresentam baixos rendimentos, quando comparados a queijos produzidos com leite integral. DRAKE & SWANSON (1995) esclareceram que queijos com baixo teor de gordura apresentam rendimento menor, já que, normalmente, a gordura representa 50% ou mais do extrato seco total. A gordura é um dos componentes que está presente em maior quantidade no leite. Durante o processo de produção dos queijos, essa gordura fica presa na matriz de caseína. Dessa forma, é esperado que o rendimento de queijos *light* seja menor que os obtidos para os queijos tradicionais, uma vez que o aumento da umidade dos queijos *light* não é suficiente para manter valores constantes nos rendimentos das produções, conforme reportado por RUDAN *et al.* (1999).

De fato, os valores de rendimento obtidos para os queijos produzidos com leite desnatado neste trabalho foram menores que os rendimentos obtidos por BURITI *et al.* (2005a) e BURITI *et al.* (2005b), em estudo realizado com queijo minas frescal adicionados de *L. paracasei* e *L. acidophilus*, respectivamente.

A gordura contribui para características físicas e é a precursora de compostos responsáveis pelo *flavour* dos queijos. Os queijos produzidos com baixa concentração de gordura são considerados menos aceitáveis pelos consumidores, devido aos defeitos de textura e aroma. Defeitos na textura incluem aumento da firmeza, dureza e elasticidade (BANKS, 2004), enquanto que a diminuição na intensidade de sabor e aroma característicos de queijo, sabor amargo e adstringência são alguns defeitos de aroma apresentado por esse tipo de queijo (KONDYLI *et al.*, 2005).

No presente trabalho, os queijos produzidos com leite desnatado apresentaram-se mais firmes quando comparados aos queijos produzidos com leite integral. Tal fato pode ser explicado com base na baixa concentração de gordura, que afeta a matriz dos queijos, resultando na formação de uma rede de para-caseína muito mais firme, resultando em queijos excessivamente mais duros (BANKS, 2004).

Semelhantemente, KAVAS *et al.* (2004) observaram que a diminuição nas percentagens de gordura dos queijos revelou produtos com maior umidade e aumento na dureza ao longo do armazenamento, além de apresentarem-se mais duros que os queijos tradicionais. Da mesma forma, queijos cheddar produzidos com leite desnatado freqüentemente são excessivamente firmes e mais difíceis de mastigar (BANKS, 2004).

Entretanto, embora os queijos com teor reduzido de gordura sejam classificados por alguns autores como queijos de qualidade inferior (MICHIDA *et al.*, 2003), conforme reportado por VINDEROLA *et al.* (2000a), meios com baixas concentrações de gordura são favoráveis à multiplicação e sobrevivência de bactérias probióticas. Tal fato foi observado no presente trabalho, uma vez que as populações de *L. acidophilus* observadas nos queijos T2L e T3L estudados foram superiores ao mínimo exigido para um alimento probiótico.

4.4.2. Viabilidade da bactéria *starter*

A Tabela 8 apresenta as populações de *Streptococcus thermophilus* (média e variação) obtidas para os queijos T3.

Os queijos T3 apresentaram populações de *S. thermophilus* acima de 7,00 log UFC/g durante todo o armazenamento refrigerado. CARMINATI *et al.* (2001) estudaram queijo mascarpone, não maturado, obtido a partir de coagulação térmica ácida, adicionando-se ácido tartárico ou cítrico à nata do leite, seguida de coagulação a 80°C/15 minutos. Os autores obtiveram populações de *S. thermophilus* de aproximadamente 10⁷ UFC/g somente após 10 dias de armazenamento a 24°C, sendo que populações de 10⁶ UFC/g foram obtidas na metade desse período.

VINDEROLA *et al.* (2000b), em pesquisa realizada com queijo fresco, adicionaram *S. thermophilus* como cultura *starter* em co-cultura com cepas probióticas de *L. acidophilus*, *B. longum* e *L. casei*. Em todos esses queijos, *S. thermophilus* atingiu populações superiores a 8 log UFC/g.

Tabela 8. Populações de *Streptococcus thermophilus* (média e variação) obtidas para o queijo T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g)		
Queijo T3		
Tempo (Dias)	Média	Variação*
0	7,23±0,69 ^a	6,25 – 7,23
1	7,33±0,67 ^a	6,30 – 7,77
7	7,09±0,48 ^a	6,04 – 7,54
14	7,67±0,39 ^a	7,00 – 7,99
21	7,97±0,49 ^a	7,09 – 8,39

*Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^a: letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento.

S. thermophilus é uma cultura homofermentativa e produz ácido láctico a partir da fermentação da glicose, além de sintetizar β-galactosidase, enzima responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose (ZISU & SHAH, 2003). É uma cultura comumente utilizada como cultura bioconservante, uma vez que produz ácidos rapidamente, acidificando o meio e inibindo a multiplicação de microrganismos patogênicos (CARMINATI *et al.*, 2001).

Embora sejam usadas extensivamente na fabricação de iogurtes, culturas *starter* termofílicas, como *S. thermophilus*, estão sendo aplicadas na fabricação de queijos, melhorando o sabor dos produtos. A cultura de *S. thermophilus* é empregada na fabricação de queijos juntamente com *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* e *L. helveticus* (FOX *et al.*, 2000; SHAH, 2000; PERRY, 2004; AYHAN *et al.*, 2005; GUARNER *et al.*, 2005).

Entretanto, recentemente, a aplicação tecnológica de *S. thermophilus* está sendo discutida, com base nos trabalhos publicados por REID *et al.* (2003) e SANDERS (2003), que classificaram a distribuição de lactase no intestino delgado realizada por *S. thermophilus* como uma atividade probiótica, mesmo esclarecendo que a cepa não resiste à passagem pelo trato gastrointestinal. Em contrapartida, pesquisas recentes

realizadas com animais (DROUAULT *et al.*, 2002) e humanos (MATER *et al.*, 2005) revelam que *S. thermophilus* é capaz de sobreviver ao trânsito intestinal.

A propriedade probiótica de *S. thermophilus* é questão atual de discussão, que gera controvérsias, pois a cepa atua como fonte de lactase no intestino delgado e sobrevive à passagem pelo trato gastrintestinal. Porém, não atende ao pré-requisito de que deve possuir origem na microbiota intestinal humana sadia (SANDERS, 2000).

Sendo *S. thermophilus* considerada uma cepa probiótica, conforme proposto por DROUAULT *et al.* (2002), REID *et al.* (2003), SANDERS (2003) e MATER *et al.* (2005), e mesmo pela legislação brasileira atual (ANVISA, 2005), pode-se afirmar que o queijo T3 pode ser caracterizado como um queijo duplamente probiótico em potencial, uma vez que as populações de *S. thermophilus* encontradas permaneceram acima de 7,00 log UFC/g durante a produção (dia 0) e todo o armazenamento refrigerado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Entretanto, deve ser salientado que o potencial probiótico do queijo T3 apresenta maior possibilidade de ocorrer, em virtude da presença de *L. acidophilus* La-5, cepa esta também presente no queijo T2. Essa hipótese tem como base o fato, mencionado anteriormente, da cepa La-5 de *L. acidophilus* ser comprovadamente probiótica, através de estudos com seres humanos (JUNTUNEN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004).

Apesar disso, devido ao fato de que, no presente trabalho, o queijo T3 ter apresentado elevadas populações de *S. thermophilus* durante todo o armazenamento, esse produto pode ser bastante promissor, em termos de algumas propriedades probióticas peculiares. Como exemplo, pode ser citada a sua atuação na melhoria da má digestão da lactose, em indivíduos com intolerância a esse açúcar. A esse respeito, estudos reportaram que as culturas do iogurte, incluindo *S. thermophilus*, atuam melhor que cepas de *Lactobacillus* na má digestão da lactose. Estudos *in vitro* realizados para a quantificação da lactase produzida por *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Streptococcus thermophilus*, demonstraram que os níveis de lactase produzidos pela cultura *starter* foram maiores que os níveis produzidos pela bactéria probiótica (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001).

A tabela 9 apresenta as populações de *S. thermophilus* (média) observadas ao longo do armazenamento dos queijos T3 produzidos com leite desnatado (T3L). O baixo teor de gordura do leite não impediu que a cultura *starter* se multiplicasse durante a vida de prateleira dos produtos. As populações de *S. thermophilus* aumentaram de

6,84 log UFC/g para 7,89 UFC/g entre o 1º e o 21º dia de armazenamento ($p < 0,05$) para esses queijos. As populações de *S. thermophilus* observadas para os queijos T3L foram estatisticamente iguais às populações observadas nos queijos produzidos com leite integral (T3) durante o armazenamento. Nos queijos *light*, as populações de *S. thermophilus* observadas durante a produção (dia 0) e no 1º dia de armazenamento, foram menores que as populações observadas para T3 no mesmo período, embora a análise estatística não tenha apontado diferença significativa quando T3 e T3L foram comparados entre si nesses períodos de armazenamento. Um aumento significativo nas populações de T3L foi observado após o 1º dia de armazenamento, fato não observado nos queijos T3 (Tabela 10).

Em estudo realizado com queijo cheddar com reduzido teor de gordura (17,5%), FENELON *et al.* (2002) estudaram a viabilidade de diferentes cepas de microrganismos *starter* adicionados ao produto. Quando *S. thermophilus* foi adicionado ao queijo, os autores observaram um comportamento diferente do obtido no presente trabalho, uma vez que as populações de *S. thermophilus* diminuíram aproximadamente 3,3 log UFC/g durante o armazenamento do produto.

Tabela 9. Populações de *Streptococcus thermophilus* (média e variação) obtidas para o queijo T3L (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), produzido com leite desnatado, durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g)		
Queijo T3L		
Tempo (Dias)	Média	Variação*
0	6,84±0,47 ^a	6,30 – 7,10
1	6,58±0,06 ^a	6,51 – 6,68
7	7,26±0,05 ^b	7,21 – 7,34
14	7,05±0,19 ^b	6,91 – 7,19
21	7,89±0,04 ^b	7,85 – 7,94

*Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^a: letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento.

Tabela 10. Populações de *Streptococcus thermophilus* (média) obtidas para os queijos T3 e T3L (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*) produzidos com leite integral (T3) e desnatado (T3L), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g)		
Queijos		
Tempo (Dias)	T3	T3L
	Média	
0	7,23±0,69 ^{Aa}	6,84±0,47 ^{Aa}
1	7,33±0,67 ^{Aa}	6,58±0,06 ^{Aa}
7	7,09±0,48 ^{Aa}	7,26±0,05 ^{Ab}
14	7,67±0,39 ^{Aa}	7,05±0,19 ^{Ab}
21	7,97±0,49 ^{Aa}	7,89±0,04 ^{Ab}

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

4.4.3. Bactérias indicadoras de contaminação - *Staphylococcus* spp., coliformes totais e *Escherichia coli*

A Tabela 11 apresenta os valores das populações de *Staphylococcus* spp. (média e variação) obtidas para os queijos estudados. O queijo controle (produzido sem a adição de nenhum tipo de cultura), embora tenha apresentado rendimento médio ligeiramente maior que os queijos T2 e T3, apresentou maior contaminação quando comparado aos queijos adicionados de culturas. Tal fato refletiu-se nos resultados da análise sensorial, que será discutida no tópico **4.7**. Os queijos T1 apresentaram um aumento constante nas populações de *Staphylococcus* spp. ao longo do armazenamento, tendo aumentado de 2,68 para 5,22 log UFC/g entre o dia da produção (dia 0) e o 21º dia de armazenamento. Em contrapartida, os queijos adicionados de culturas probióticas, T2 e T3, apresentaram aumentos de apenas 0,79 e 0,54 log UFC/g, respectivamente, durante todo o período de armazenamento refrigerado. Esse fato mostrou que a adição da bactéria probiótica La-5 evitou a multiplicação do contaminante nos queijos T2 e T3, conferindo-lhes uma maior proteção. Possivelmente, a cultura *starter* também contribuiu, impedindo a multiplicação de contaminantes no queijo T3, uma vez que a produção de bacteriocinas por *S. thermophilus* é documentada (IVANOVA *et al.*, 1998; HOLLINGSWORTH, 2001).

Tabela 11. Populações de *Staphylococcus* spp. (média e variação) obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de <i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/g)						
Queijos						
Tempo (Dias)	T1		T2		T3	
	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**
0	2,68	<2 – 3,18	3,19	<2 – 3,78	3,33	2,47 – 3,69
1	3,19	<2 – 3,48	3,78	3,18 – 4,11	3,45	2,44 - 3,77
7	3,23	<2 – 3,70	3,74	2,00 – 4,23	3,78	2,81 – 4,20
14	4,36	3,00 – 5,08	3,81	3,70 – 3,90	3,74	3,60 – 3,85
21	5,22	3,48 – 5,56	3,98	<2 – 4,30	3,87	2,00 – 4,25

*Média para as amostras positivas.

**Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

As bactérias lácticas são capazes de produzir moléculas bioativas durante a fermentação, como ácidos orgânicos, que promovem a queda do pH, peróxido de hidrogênio e diacetil, além de peptídeos ou proteínas com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (bacteriocinas), que apresentam atividade contra determinados microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. As bacteriocinas são compostos com atividade bacteriostática ou bactericida contra microrganismos susceptíveis. Embora as bacteriocinas possuam propriedades antibióticas, não são denominadas como tal. Isto ocorre no sentido de evitar que sejam classificadas, inadequadamente como antibióticos terapêuticos, os quais podem causar reações alérgicas em humanos (DERAZ *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a maioria das cepas de *Lactobacillus* freqüentemente produz bacteriocinas, as quais inibem a multiplicação de determinadas cepas de contaminantes (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001).

Lactobacillus acidophilus é capaz de produzir vários compostos antimicrobianos, como, por exemplo, a bacteriocina acidocina CH5, acidocina D20079, acidofilina 801 e o ácido fenil láctico, os quais estão envolvidos na qualidade e na proteção dos alimentos (CHUMCHALOVÁ *et al.*, 1998; ZAMFIR *et al.*, 2000; VALERIO *et al.*, 2004; DERAZ *et*

al., 2005). Em estudo realizado com *L. acidophilus* NCFM, GILLILAND & SPECK (1977) observaram atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Clostridium perfringens*, microrganismos estes responsáveis por toxinfecções de origem alimentar. Os autores atribuíram a inibição de 80 a 90% desses patógenos à produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e, possivelmente, a outros produtos antimicrobianos produzidos por *L. acidophilus*, como, por exemplo, bacteriocinas.

Observando-se as populações iniciais de *Staphylococcus* spp. durante o processamento do queijo minas frescal (dia 0) para T1, T2 e T3 (2,68, 3,19 e 3,33 log UFC/g, respectivamente), nota-se que a adição de culturas aos queijos T2 e T3 inibiu a multiplicação do contaminante, uma vez que as populações de células iniciais estavam próximas entre si e, ao longo do armazenamento, T1 apresentou um constante aumento nas populações de *Staphylococcus* spp. O pH diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para os queijos adicionados de culturas, o que certamente contribuiu para a proteção dos queijos T2 e T3. Tal fato não foi observado por MACEDO *et al.* (2004) em queijo serra-da-estrela, adicionado de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*, uma vez que essas culturas não impediram a multiplicação de *Staphylococcus* spp. durante todo o armazenamento dos queijos.

ALEGRO (2003) encontrou comportamento semelhante em queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La-5, que apresentou populações de 10^3 UFC/g de *Staphylococcus* spp., com 21 dias de armazenamento.

A Tabela 12 apresenta os valores das populações de coliformes totais (média e variação) verificadas para os queijos estudados. Em nenhum dos queijos estudados foi detectada a presença de *E. coli*.

Tabela 12. Populações de coliformes totais (média e variação) obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), durante o processamento (dia 0) e após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C.

Populações de Coliformes totais (log UFC/g)						
Queijos						
Tempo (Dias)	T1		T2		T3	
	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**
0	<1	–	1,00	<1 – 1,00	1,30	<1 – 1,30
1	<1	–	1,00	<1 – 1,00	1,86	<1 – 2,64
7	2,07	<1 – 2,07	<1	–	2,60	<1 – 2,65
14	<1	–	<1	–	2,31	<1 – 3,69
21	<1	–	2,04	<1 – 2,08	1,24	<1 – 1,30

*Média das amostras positivas.

** Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

– = sem variação.

Em estudo realizado por PIDCOCK *et al.* (2002) com salame, uma diminuição significativa de aproximadamente 2 logs foi detectada nas populações de *E. coli* quando cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* foram adicionadas separadamente e em co-cultura com cultura *starter* marca comercial FloraCarn FF1-200, composta por *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*.

No presente trabalho, ao contrário do observado com *Staphylococcus* spp., o probiótico não inibiu a multiplicação de coliformes totais. Para os queijos T1, as populações médias das amostras positivas para o contaminante foram de 2,07 log UFC/g apenas ao 7º dia de armazenamento refrigerado. Da mesma forma, T3 apresentou populações de 2,60 log UFC/g no mesmo dia de análise, com valores menores no restante dos dias analisados. O queijo T2 apresentou populações de 2,04 log UFC/g apenas no último dia do armazenamento do produto (Tabela 12). Semelhantemente, VINDEROLA *et al.* (2000b) em queijo fresco adicionado de culturas probióticas encontrou populações de coliformes abaixo de 10³ UFC/g.

A legislação brasileira vigente estabelece que queijos com muito alta umidade, como o queijo minas frescal, apresentem como limites máximos a presença de 5 × 10²

UFC/g de coliformes a 45°C, 5×10^2 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase-positivos e ausência em 25 gamas de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, para queijos produzidos sem a adição de culturas lácticas, como o queijo T1 (controle) produzido neste trabalho. Para queijos também de alta umidade, porém, com adição de culturas lácticas abundantes e viáveis, os valores permitidos de coliformes a 45°C e de *Staphylococcus* coagulase positiva são de 5×10^3 UFC/g (ANVISA, 2001). Desta forma, todos os queijos se adequaram à legislação vigente, exceto o queijo T1, que apresentou populações de *Staphylococcus* spp. superiores aos valores permitidos de *Staphylococcus* coagulase-positivos.

Entretanto, deve ser salientado que normalmente a maioria das colônias de *Staphylococcus* spp. que não possuem o aspecto e tamanho típico de *Staphylococcus aureus*, como a maioria daquelas isoladas dos queijos estudados no presente trabalho, não são confirmadas como *Staphylococcus* DNase positivos e/ou coagulase-positivos, que incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, conforme observado no trabalho realizado por BURITI (2005). Além disso, são necessárias concentrações de *Staphylococcus aureus* de aproximadamente 10^6 UFC/g no alimento para que se inicie a produção de uma concentração suficiente de enterotoxinas (0,1-1,0 mg/kg) para que ocorra uma intoxicação alimentar (NEAVES & WILLIAMS, 1999; FOX, 2000). Sendo assim, esse parâmetro foi utilizado apenas no sentido de acompanhar a evolução da microbiota contaminante durante o armazenamento refrigerado dos diferentes tipos de queijo estudados e visando a comparação entre eles.

4.5. Índice de extensão da proteólise

A proteólise é o mais complexo dos três eventos primários que ocorrem na maturação dos queijos e é provavelmente o mais importante para o desenvolvimento de sabor e textura. Durante a maturação, a proteólise pode ser catalisada por enzimas provenientes do coagulante, do leite ou de enzimas provenientes do metabolismo de culturas *starter* (SOUSA *et al.*, 2001). Embora não se trate de um produto maturado e sim fresco, conforme relatado anteriormente, o queijo minas frescal sofre alterações bioquímicas ao longo do seu armazenamento. Essas transformações podem ser

acentuadas devido à adição de culturas ao produto, como *L. acidophilus* e *S. thermophilus*, empregadas no presente trabalho.

A contribuição da proteólise ao sabor é causada pelo aumento nos peptídeos, aminoácidos livres, aminas, ácidos, tiols e tioésteres, formados durante o processo de degradação (HELLER *et al.*, 2003; PRIETO *et al.*, 2004).

A Tabela 13 apresenta os resultados do índice de extensão da proteólise no produto final (dia 1) e após 21 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, bem como o aumento da proteólise durante a estocagem para aos diferentes queijos estudados. Queijos produzidos com alta concentração de sal apresentam menor proteólise ao longo do armazenamento, uma vez que a alta concentração de sal inibe a proteólise (ALIZADEH *et al.*, 2006). O queijo minas frescal é um queijo que possui baixa concentração de sal, que varia dependendo do tipo de salga (1% para salga em superfície e 2% para salga feita na massa).

No presente trabalho, o tipo de salga realizada foi a salga na massa. Desta maneira, a proteólise ocorreu em todos os queijos, sem ser afetada pela concentração de sal adicionada. Para todos os queijos estudados, houve um aumento significativo no índice de extensão da proteólise ao longo do armazenamento refrigerado ($p < 0,05$). Quando os queijos foram comparados entre si, todos diferiram significativamente quanto às percentagens de aumento da proteólise ($p < 0,05$). Os queijos T3 apresentaram o maior aumento no índice de extensão da proteólise (95,44%), seguido de T2 e T1. Ao 1º dia de análise, T1 diferiu significativamente dos queijos T3, apresentando maior proteólise ($p < 0,05$). Teoricamente, T1 deveria apresentar valores de proteólise menores que T2 e T3, uma vez que foi produzido sem a adição de culturas. Entretanto, os valores relativamente altos encontrados para T1 estão, provavelmente, relacionados à presença de enzimas de microrganismos contaminantes. CUNHA *et al.* (2006) observaram o aumento da proteólise em queijo minas frescal produzido com acidificação direta do leite e atribuíram este aumento à presença de contaminantes, entre eles, microrganismos resistentes à pasteurização do leite, além de bolores e leveduras, presentes devido à contaminação pós-pasteurização do leite.

Ao 21º dia de armazenamento, o queijo T1 diferiu significativamente quanto à proteólise somente quando comparado ao T3, que apresentou maiores valores de proteólise ($p < 0,05$). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que ambas as culturas adicionadas à T3 são proteolíticas, embora *L. acidophilus* seja menos

proteolítica que *S. thermophilus* (que apresentou populações próximas de 8 log UFC/g) e promoveram uma maior proteólise em T3. Embora os queijos T2 foram produzidos com a adição de *L. acidophilus*, os valores de proteólise não diferiram significativamente de T1, pois *L. acidophilus* é uma cepa fracamente proteolítica (SHIHATA & SHAH, 2000). Embora os queijos T3 apresentaram maior proteólise ao 21º dia, não diferiram significativamente dos valores encontrados para os queijos T2, provavelmente em virtude da proteólise causada por *L. acidophilus*.

Ao longo do armazenamento, o maior aumento na proteólise ocorreu no queijo T3 (95,44%), que foi adicionado de *Streptococcus thermophilus*. Maiores percentagens de aumento na proteólise em queijo minas frescal foram observadas por BURITI *et al.* (2005a) quando os queijos foram adicionados de cultura láctica tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris*).

Na análise sensorial realizada no presente trabalho, que será discutida no item 4.7, os queijos T3 apresentaram boa aceitação pelos provadores. Entretanto, ao contrário dos demais queijos estudados, os T3 foram definidos pela maioria dos provadores como “amargos” ou “azedos”. Tal fato deve-se, provavelmente, à intensa proteólise que ocorreu nos queijos T3 e a queda do pH, respectivamente. A proteólise contribui para a produção de peptídeos e de aminoácidos livres; compostos responsáveis pela formação do *flavour* em queijos. O catabolismo de aminoácidos pode resultar em vários compostos, incluindo amônia, aminas, acetaldeídos, fenóis e álcoois que podem contribuir para a formação do *flavour* em queijos (SOUZA *et al.*, 2001).

Normalmente, os peptídeos menores são os responsáveis pela formação do *flavour*, enquanto que os peptídeos maiores contribuem com a textura dos queijos. Entretanto, em alguns casos, os peptídeos menores formam, juntamente com os maiores a base dos defeitos de sabor, destacando-se o amargor. Os peptídeos responsáveis pelo amargor dos queijos podem ser hidrolisados a peptídeos menores e aminoácidos não amargos pelas enzimas das bactérias lácticas, comportamento que foi observado em algumas linhagens de *Lactobacillus* (SOUZA *et al.*, 2001; MORENO, 2003).

Em estudo com queijo cheddar, LAW *et al.* (1993) observaram o aumento da proteólise ao longo do armazenamento dos queijos, atribuído à presença da cultura *starter* de *Lactococcus lactis*. Os autores consideraram que as proteinases da bactéria *starter*, juntamente com o coagulante, possivelmente sejam os responsáveis pelo

aumento dos peptídeos no queijo. Desta forma, o substrato para a ação das peptidases da bactéria *starter* torna-se mais abundante, facilitando a produção de peptídeos menores e aminoácidos que contribuem para o *flavour* dos queijos.

Provavelmente, o fato de os queijos T2 não terem sido classificados pelos provadores como “amargos” ou “azedos”, mesmo com o aumento da proteólise ao longo do armazenamento (76,90%) esteja relacionada com a maior degradação dos peptídeos responsáveis pelo amargor.

Tabela 13. Índice de extensão da proteólise (média±desvio-padrão) no produto final (dia 1) e após 21 dias de armazenamento a 5±1°C e o aumento da proteólise durante a estocagem para os diferentes queijos minas frescal estudados.

Queijos	Índice de Extensão da Proteólise (%)		Aumento (%)*
	Dia 1	Dia 21	
T1	12,87±0,75 ^{Aa}	16,28±1,34 ^{Ab}	26,50 ^A
T2	10,04±0,60 ^{ABa}	17,76±1,06 ^{ABb}	76,90 ^B
T3	9,44±0,59 ^{Ba}	18,45±1,15 ^{Bb}	95,44 ^C

$$* \left[\frac{\text{Dia 21} - \text{Dia 1}}{\text{Dia 1}} \right] \times 100$$

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

4.6. Textura instrumental

Durante muitos anos, a textura permaneceu como um atributo esquecido, uma vez que recebia pequena atenção, quando comparada ao sabor. Posteriormente, a textura passou a ser considerada um dos maiores determinantes da preferência e aceitação de alimentos e bebidas (GUINARD & MAZZUCHELLI, 1996).

Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, com a função de simular a mastigação entre os molares. A amostra é submetida a duas “mordidas” ou corridas, que simulam o ato de mastigação. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força - compressão é traçada. A partir dessa curva, obtêm-se os parâmetros primários - dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e secundários - mastigabilidade e

gomosidade, que compõem as características mecânicas dos queijos (FOX *et al.*, 2000).

No presente trabalho, foram analisados os perfis instrumentais de dureza, coesividade, elasticidade, adesividade, mastigabilidade e gomosidade. A Figura 5 apresenta uma curva típica do perfil de textura da análise de queijo minas frescal, empregando-se texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) e o programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems). A Tabela 14 apresenta os dados de textura instrumental (média±desvio-padrão), obtidos para os parâmetros dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade dos queijos T1, T2 e T3. Os valores de adesividade são apresentados em módulo.

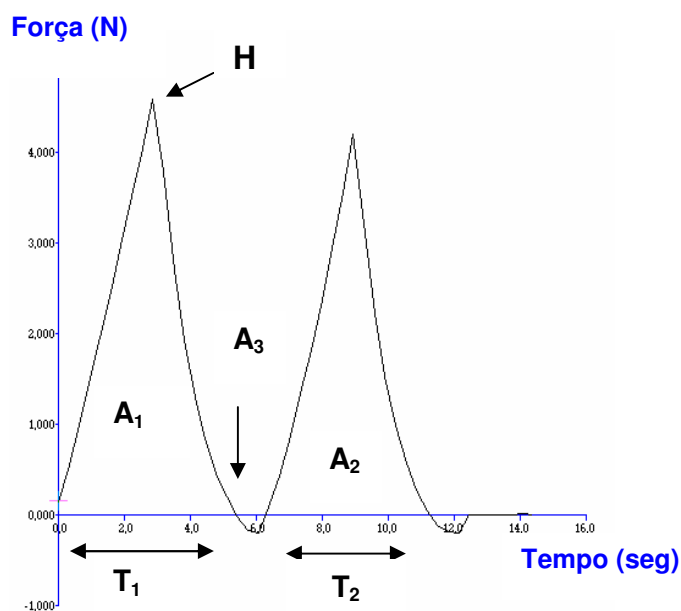


Figura 5. Gráfico da análise do perfil de textura obtido para o queijo minas frescal T2. **Dureza** = H; **Coesividade** = A_2/A_1 ; **Adesividade** = A_3 ; **Elasticidade** = T_2/T_1 ; **Mastigabilidade** = $H \times (A_2/A_1) \times (T_2/T_1)$ e **Gomosidade** = $H \times (A_2/A_1) \times 100$.

Tabela 14. Perfil de textura instrumental (média ± desvio-padrão)¹ dos queijos T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), no produto final (1 dia) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 5±1°C.

Queijos	Tempo (Dias)	Dureza (N)	Coesividade	Adesividade ² (N s)	Elasticidade	Gomosidade (N)	Mastigabilidade
T1	1	2,07±0,27 ^{Aa}	0,74±0,001 ^{ACa}	0,066±0,013 ^{Aa}	0,97±0,014 ^{Aa}	1,53±0,19 ^{Aa}	1,40±0,18 ^{Aa}
	7	2,98±0,41 ^{Ab}	0,77±0,001 ^{Ab}	0,052±0,046 ^{Ab}	0,92±0,021 ^{Ab}	2,31±0,33 ^{Ab}	2,13±0,29 ^{Ab}
	14	3,60±0,49 ^{Ac}	0,78±0,001 ^{Ab}	0,055±0,036 ^{Ab}	0,91±0,018 ^{Aac}	2,82±0,39 ^{Abc}	2,57±0,35 ^{ACc}
	21	3,70±0,75 ^{Ac}	0,77±0,001 ^{Ab}	0,066±0,048 ^{Aab}	0,90±0,021 ^{Ac}	2,86±0,57 ^{Ac}	2,58±0,51 ^{Ac}
T2	1	2,82±0,53 ^{Aa}	0,76±0,020 ^{Ba}	0,030±0,023 ^{Ba}	0,91±0,015 ^{Aa}	2,14±0,42 ^{Ba}	1,96±0,38 ^{Ba}
	7	3,88±1,09 ^{BCb}	0,77±0,021 ^{Aa}	0,046±0,038 ^{Aabc}	0,91±0,022 ^{Aa}	3,03±0,88 ^{Bb}	2,79±0,81 ^{Bb}
	14	3,91±0,46 ^{Bb}	0,77±0,019 ^{Aa}	0,050±0,031 ^{Ab}	0,90±0,016 ^{Aa}	2,89±0,45 ^{Ac}	2,62±0,40 ^{Bb}
	21	3,97±0,40 ^{Ab}	0,78±0,010 ^{BCa}	0,057±0,040 ^{Ac}	0,91±0,014 ^{Aa}	2,97±0,39 ^{Abc}	2,72±0,34 ^{Ab}
T3	1	2,29±0,45 ^{Aa}	0,75±0,013 ^{BCa}	0,045±0,030 ^{Ba}	0,91±0,01 ^{Aa}	1,74±0,34 ^{Ca}	1,58±0,31 ^{Ca}
	7	3,49±0,66 ^{Cb}	0,78±0,009 ^{Ab}	0,028±0,029 ^{Ab}	0,92±0,01 ^{Aa}	2,74±0,51 ^{Bb}	2,53±0,48 ^{Bb}
	14	3,27±0,47 ^{Ab}	0,78±0,009 ^{Ab}	0,031±0,027 ^{Ab}	0,91±0,02 ^{Aa}	2,59±0,38 ^{Bb}	2,36±0,35 ^{Cb}
	21	3,42±0,54 ^{Ab}	0,78±0,009 ^{Cb}	0,036±0,039 ^{Ab}	0,91±0,02 ^{Aa}	2,68±0,42 ^{Ab}	2,46±0,39 ^{Ab}

¹ Médias de 26 repetições.

² Valores em módulo.

^{A,B,C}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo estudado.

A dureza é definida como a força requerida para comprimir o queijo entre os dentes molares ou entre a língua e o palato, dando um ponto de deformação ou penetração. A gomosidade, definida como a energia necessária para desintegrar um pedaço de queijo, tornando-o apto a ser deglutido, e a mastigabilidade, como o tempo ou o número de mastigações necessárias para o queijo estar pronto para ser deglutido, são parâmetros de textura derivados da dureza (FOX *et al.*, 2000).

Durante o armazenamento refrigerado, houve um aumento significativo na dureza para os queijos T1 e T2 ($p < 0,05$), acompanhado do aumento significativo da sinerese (Tabela 3), bem como para os parâmetros derivados da dureza. Os queijos T3 apresentaram aumento na dureza entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. Após este período, os valores de dureza diminuíram, porém sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

Semelhantemente, BURITI *et al.* (2005b) constataram o aumento da dureza e dos parâmetros derivados - gomosidade e mastigabilidade - em queijo minas frescal adicionado de *L. acidophilus* e ácido láctico, bem como para o queijo adicionado somente de ácido láctico. Em contrapartida, os queijos adicionados de cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* mais cultura *starter* tipo O apresentaram diminuição nos valores de dureza, sendo caracterizados pelos autores como queijos com textura mais frágil, como o observado para os queijos T3 no presente trabalho. Os autores atribuíram esta diminuição na dureza ao aumento da proteólise durante o armazenamento dos queijos. Entretanto, os queijos adicionados de cultura *starter* tipo O apresentaram maior grau de proteólise (131%), enquanto que o aumento na proteólise nos queijos adicionados de *L. acidophilus* e *S. thermophilus* deste trabalho foi inferior (95,44%). Possivelmente, as culturas tipo O são mais proteolíticas que culturas *starter* de *S. thermophilus*. No presente trabalho, utilização de uma cultura que garantisse uma menor pós-acidificação dos produtos, como *S. thermophilus*, resultou em queijos com valores de textura próximos aos valores obtidos para queijos comerciais por ROCHA *et al.* (2006). Entretanto, os valores de dureza observados no presente trabalho não foram exatamente iguais, mas sim próximos aos observados por ROCHA *et al.*, (2006). Tal fato já era esperado uma vez que lotes de um mesmo fabricante de queijos apresentam uma grande heterogeneidade nos valores de textura.

ROCHA *et al.* (2006) verificaram que os valores de dureza instrumental variaram bastante entre os queijos de diferentes marcas comerciais analisados. Esta variação

pode estar relacionada, segundo os autores, a fatores como o nível de contaminação, visto que os queijos com menores níveis de contaminação apresentaram valores de dureza instrumental mais estáveis.

No presente trabalho, quando os queijos foram comparados entre si, T1 diferiu dos demais queijos ao 7º dia e de T2 ao 14º dia. Além disso, T3 apresentou menor dureza que T2 ao 14º dia de armazenamento.

Com o aumento da acidez dos produtos, há concomitante queda nos valores de pH, o que afeta os queijos diretamente, diminuindo as concentrações de cálcio presentes. Estas alterações na concentração de cálcio determinam queijos de textura mais mole, que são facilmente fragmentados (YAZICI & DERVISOGLU, 2003). Entretanto, a produção de queijos na faixa de pH próxima a 6,1 resulta em queijos firmes, com distribuição uniforme de proteínas na matriz protéica (LEE & KLOSTERMEYER, 2001).

LEE & KLOSTERMEYER (2001) destacaram que um controle minucioso do pH deve ser realizado, para a obtenção de queijos com propriedades de textura desejáveis.

No presente trabalho, a partir do 7º dia de armazenamento, T3 diferiu significativamente dos demais queijos quanto à acidez, apresentando-se mais ácido e com valores de dureza menores que os obtidos para T2, embora não foi detectada diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). A partir do 14º dia de armazenamento, o queijo T3 apresentou maior acidificação, diferindo significativamente dos demais ($p < 0,05$), o que, possivelmente, determinou valores de dureza menores do que aqueles encontrados para T1 e T2, embora a análise estatística tenha detectado diferença significativa apenas entre T3 e T2 para o parâmetro dureza ao 14º dia de armazenamento. Entretanto, visualmente e na análise sensorial, os queijos T3, apresentavam-se firmes, com características de textura próprias para o consumo.

Embora os queijos T1 não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos demais, ao 1º dia de armazenamento, o queijo apresentava-se mais mole, com textura visualmente mais macia. Instrumentalmente, a análise de textura revelou valores mais baixos de dureza para T1. A alta umidade de T1 ao 1º dia, possivelmente determinou estes resultados, uma vez que a alta umidade enfraquece a rede de proteínas, resultando em queijos menos firmes (AHMED *et al.*, 2005).

STAMPANONI & NOBLE (1991) obtiveram aumento na dureza e na elasticidade de queijos ao longo do armazenamento, quando o pH apresentou queda de aproximadamente 1,2 pontos. Resultados semelhantes foram observados neste trabalho para a dureza dos queijos T1 e T2. Entretanto, só foi observada queda nos valores de elasticidade para o queijo T1, enquanto que T2 e T3 permaneceram com valores próximos entre si, sem quedas significativas ($p > 0,05$). Possivelmente, a queda nos valores de pH de T1 influenciou os valores da elasticidade do produto, uma vez que, conforme reportado por LEE & KLOSTERMEYER (2001), queijos com menores valores de pH apresentam menor elasticidade.

A proteólise que ocorre durante o armazenamento dos queijos resulta em modificações na textura dos queijos, devido à quebra na sua matriz protéica (FOX *et al.*, 2000; BURITI *et al.*, 2005b). Desta forma, a proteólise está correlacionada com o decréscimo dos valores dos parâmetros de textura, entre eles a dureza e a elasticidade (TUNICK *et al.*, 1997). Entretanto, no presente trabalho, embora todos os queijos apresentaram um aumento na proteólise entre o 1º e o 21º dia de armazenamento (Tabela 13), os valores de dureza aumentaram para os queijos T1 e T2. Tal fato pode ser explicado pelo aumento da sinerese e conseqüente diminuição significativa na umidade desses queijos. Ao contrário do observado para T1 e T2, o queijo T3 apresentou diminuição na dureza, devido aos fatores citados e à maior proteólise detectada ao longo do armazenamento. Comportamento semelhante foi observado para os parâmetros de textura derivados da dureza.

MENÉNDEZ *et al.* (2000) observaram diferenças entre queijos arzáa-ulloa produzidos com culturas *starter* contendo *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* e queijos adicionados *Lactobacillus*. Os autores relataram que os queijos-controles apresentaram maior firmeza, quando comparados aos queijos contendo *Lactobacillus*, efeito este não detectado no presente trabalho.

A coesividade é definida como a extensão que um queijo pode ser deformado até que haja ruptura da sua estrutura (FOX *et al.*, 2000). Todos os queijos estudados apresentaram comportamento semelhante, quanto ao atributo coesividade. Os valores de coesividade aumentaram significativamente para os queijos T1 e T3 entre o 1º e o 7º dia de armazenamento, comportamento que não foi observado para T2. Após a primeira semana, os queijos permaneceram com valores de coesividade muito

próximos, não diferindo ao longo do armazenamento para cada queijo e também entre os queijos estudados ($p > 0,05$).

A adesividade é definida como a força requerida para remover o queijo que adere à boca, geralmente ao palato, durante o processo normal de mastigação (FOX *et al.*, 2000), sendo calculada através da área do gráfico gerada abaixo da linha do eixo x (A_3 , Figura 5). Os queijos T1 diferiram dos demais queijos quanto à adesividade apenas ao 1º dia de armazenamento ($p < 0,05$), apresentando maior adesividade. Os queijos T3 apresentaram diminuição nos valores de adesividade ao longo do armazenamento, possivelmente devido à presença da cultura *starter*. Células de *Streptococcus thermophilus* produzem polissacarídeos extracelulares como um dos produtos de seu metabolismo (HOLS *et al.*, 2005), que podem afetar a textura de queijos, conforme relatado por AHMED *et al.* (2005), que obtiveram queijos com valores de adesividade, dureza e consistência menores, quando comparados a queijos produzidos com adição de culturas não produtoras de polissacarídeos extracelulares.

Quando os queijos foram comparados entre si, não foi detectada diferença significativa entre eles em nenhum dos períodos analisados para o parâmetro elasticidade - grau de recuperação da deformação causada a um pedaço de queijo depois que a força de deformação é removida (FOX *et al.*, 2000).

Contudo, os resultados obtidos para os queijos probióticos na análise instrumental de textura, embora alguns tenham diferido significativamente de outros, são resultados aceitáveis, pois as características de textura dos produtos foram aceitas pelos consumidores, uma vez que os queijos adicionados de culturas obtiveram boa aceitação por parte dos provadores na análise sensorial realizada.

4.7. Análise sensorial

A figura 6 apresenta as freqüências das notas obtidas para os queijos T1, T2 e T3 na análise sensorial conduzida após 7 dias de armazenamento refrigerado. Ao 7º dia de armazenamento, os queijos T1, T2 e T3 apresentaram bons resultados de aceitação. O queijo T1 apresentou a maior percentagem de notas iguais ou superiores a 5 aos 7 dias de armazenamento, totalizando 96,7% das respostas obtidas, dentre essas notas, 23% de notas 6, 23% de notas 7, 27% de notas 8 e 7% de notas 9. Embora não tenha

diferido significativamente dos demais queijos após 7 dias de fabricação, o queijo T3 obteve as maiores percentagens de notas 7 e 8, com 40% e 33%, respectivamente, de modo que 90% das notas para esse queijo foram iguais ou superiores a 5. O queijo T2 apresentou 7% de notas 6, 37% de notas 7 e 27% de notas 8, sendo que 83,3% das notas foram iguais ou superiores a 5 (não gostei nem desgostei).

A análise estatística indicou que não houve diferença significativa entre os três queijos na comparação sensorial realizada aos 7 dias de armazenamento ($X_0 = 2,547$; $\chi^2 = 5,991$; $p > 0,05$), onde X_0 foi obtido pelo teste de Friedman e o χ^2 tabelado para 2 graus de liberdade.

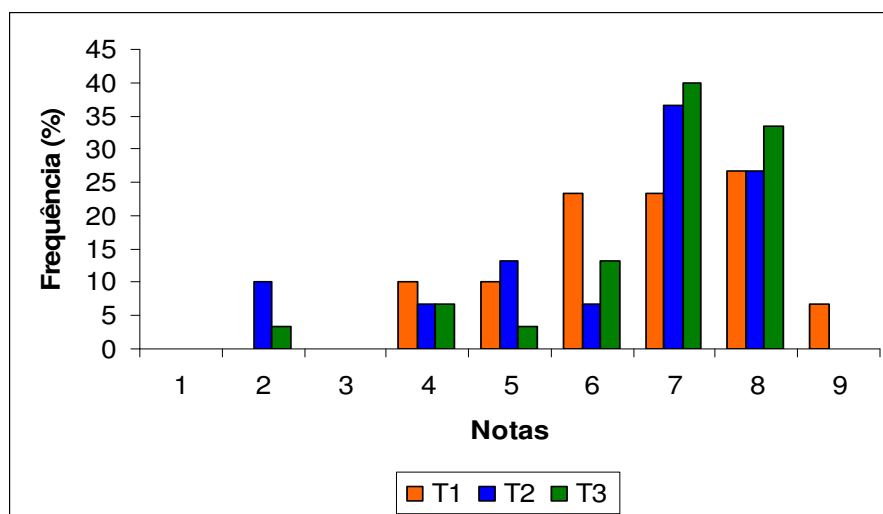


Figura 6. Freqüência das notas obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), na análise sensorial conduzida após 7 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

A análise estatística indicou que, aos 14 dias de armazenamento, os queijos probióticos T2 e T3 obtiveram notas significativamente mais elevadas ($p < 0,05$), quando comparadas ao queijo controle (T1), conforme apresentado nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Grupos homogêneos para os diferentes tipos de queijo minas frescal: T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), após 14 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Queijos	Soma das ordens (R)	Grupos homogêneos*
T1	167	A
T2	208	B
T3	197	B

*A e B na mesma coluna indicam as diferenças significativas entre os queijos ($p < 0,05$).

Tabela 16. Resultados do Teste de Friedman para a análise sensorial realizada para os diferentes tipos de queijo minas frescal: T1 (controle - sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), após 14 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tratamentos (t)	Provedores (p)	Estatística X de Friedman (X_0)	Graus de liberdade (t-1)	χ^2 tabelado (χ_c^2)
3	30	17,020	2	5,991

A Figura 7 apresenta as freqüências das notas obtidas para os queijos T1, T2 e T3 na análise sensorial conduzida após 14 dias de armazenamento refrigerado.

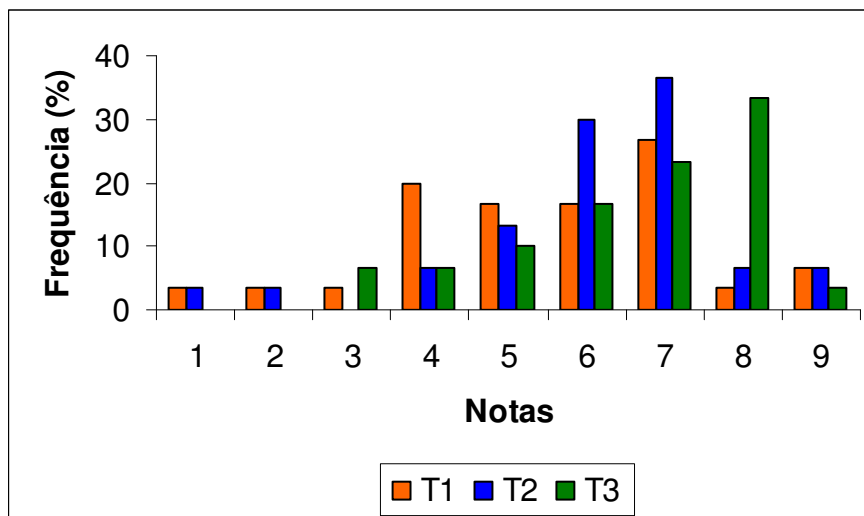


Figura 7. Frequência das notas obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), na análise sensorial conduzida após 14 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após 14 dias de armazenamento, o queijo contendo somente a bactéria probiótica (T2), apresentou as maiores percentagens de notas 6 e 7, respectivamente, 30% e 37% das respostas obtidas, também apresentando a maior percentagem de notas iguais ou superiores a 5, totalizando 93% das respostas. O queijo T3, adicionado das culturas probiótica e *starter*, apresentou a maior percentagem de notas 8 (33% das respostas) e apresentou 87% notas iguais ou superiores a 5; o queijo T1 apresentou a menor percentagem de notas iguais ou superiores a 5, sendo 17% de notas 5, 17% de notas 6 e 27% de notas 7, também aos 14 dias de armazenamento.

Comparando-se os dois períodos de análises, os queijos T2 não apresentaram diferença significativa entre 7 e 14 dias de armazenamento ($Z = -1,58$; diferença bicaudal = 0,114; $p > 0,05$). O mesmo comportamento foi observado para os queijos T3, que não apresentaram diferenças significativas entre 7 e 14 dias de armazenamento ($Z = -0,391$; diferença bicaudal = 0,695; $p > 0,05$). Por outro lado, os queijos T1 diferiram significativamente entre 7 e 14 dias de armazenamento ($Z = -2,36$; diferença bicaudal = 0,018; $p < 0,05$).

A Figura 8 mostra as percentagens de notas para os três queijos nas duas etapas da análise sensorial. Os queijos T3 foram os que se mantiveram mais estáveis durante o armazenamento, enquanto que os queijos T1 foram os que apresentaram maior comprometimento sensorial dos produtos no mesmo período. Ao contrário do observado neste trabalho, GONCU & ALPKENT (2005), observaram que a adição de cultura *starter* contendo *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarium* spp. *thermophilus* a queijo branco, afetaram a aparência e o odor dos queijos, que receberam notas baixas na avaliação sensorial. Semelhantemente, MACEDO *et al.* (2004) obtiveram notas menores para queijos serra-da-estrela adicionados de bactérias lácticas (*Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* isoladamente e em co-cultura), quando comparados sensorialmente aos queijos controle (sem adição de culturas). Os autores atribuíram a baixa aceitação à alta acidez dos queijos.

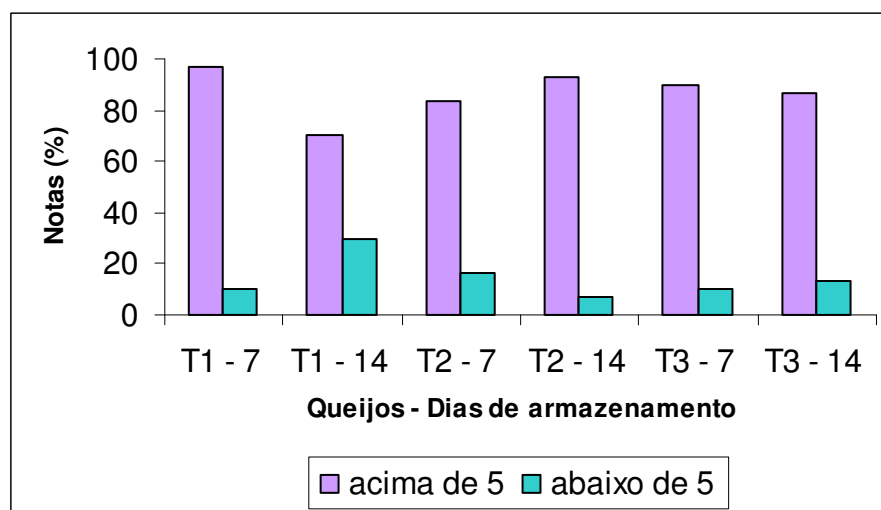


Figura 8. Percentagens de notas obtidas para os queijos T1 (controle – sem adição de culturas), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *L. acidophilus* + *S. thermophilus*), nas análises sensoriais conduzidas após 7 e 14 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Além de influenciarem as características físico-químicas e sensoriais dos queijos, certas bactérias lácticas, como as culturas *starter* e probiótica utilizadas no presente trabalho, podem ser úteis por possuírem atividade inibitória através da criação de um

ambiente hostil para os microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes (SHAH, 2000). Essas bactérias podem produzir diversos metabólitos com atividade antimicrobiana, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, álcoois, diacetil e bacteriocinas (DILLON & COOK, 1994). Dessa forma, bactérias lácticas podem ser úteis para a manutenção das características iniciais do queijo durante toda a sua vida de prateleira. A presença de bactérias lácticas nos queijos probióticos estudados (T2 e T3), conforme discutido anteriormente, inibiu o processo de deterioração desses queijos. Conseqüentemente, esses produtos tornaram-se sensorialmente mais estáveis ao longo do armazenamento, ao contrário do observado para o queijo controle, que apresentou uma diminuição significativa da aceitação sensorial no mesmo período e concomitante aumento nas populações de contaminantes.

Similarmente ao observado no presente estudo para os queijos probióticos, a adição de cepas probióticas em queijos tem sido correlacionada com a melhoria das características sensoriais. KATSIARI *et al.* (2002) verificaram que o emprego de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LBC 80, em complementação à cultura CR-213 (composta de duas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) produziu alterações sensoriais positivas na textura e sabor de queijo tipo kefalograviera com baixo teor de gordura, após 90 e 180 dias de maturação, quando comparado ao queijo controle com teor reduzido de gordura e sem a adição de culturas.

MENÉNDEZ *et al.* (2000) obtiveram a melhoria das características sensoriais de queijos arzúa-ulloa, através da redução do sabor amargo em relação ao queijo controle utilizando, individualmente, cinco cepas diferentes de *Lactobacillus* – *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* (duas cepas) e *Lactobacillus casei* (cepa comercial) – conjuntamente à cultura *starter*, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*.

De modo semelhante, JURKIEWCZ (1999) verificou que, mesmo com aumento da proteólise durante o armazenamento, a adição de *Lactobacillus acidophilus* ao queijo minas frescal não influenciou as características de textura e sabor ao longo de sua vida de prateleira (15 dias a 5° C), quando comparado ao controle.

GARDINER *et al.* (1998) e STANTON *et al.* (1998) relataram que as elevadas populações de *Lactobacillus* em queijos cheddar não produziram alterações nas características sensoriais, uma vez que apresentaram sabor e textura comparáveis ao queijo controle. GARDINER *et al.* (1998) estudaram queijo cheddar preparado com a adição de *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Lactobacillus salivarius*, enquanto que STANTON *et al.* (1998) estudaram queijo cheddar com a adição de uma cepa de *Lactobacillus paracasei*.

Em estudo realizado por BURITI *et al.* (2005a), o emprego de *Lactobacillus paracasei* LBC 82 não produziu alterações sensoriais em queijos minas frescal produzidos com acidificação direta com ácido láctico ou com acidificação com cultura mesofílica tipo O composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

5. CONCLUSÕES

❖ A adição da cultura *starter* aos queijos não afetou a viabilidade de *L. acidophilus*, que se manteve com populações satisfatórias nos produtos. Além disso, a presença da cultura *starter* promoveu uma maior acidificação dos queijos T3 e um aumento significativo na proteólise ao término do armazenamento, quando comparado aos queijos T1 e T2, características estas que não prejudicaram o seu desempenho na avaliação sensorial.

❖ A análise sensorial dos queijos produzidos com leite integral revelou que a adição da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* La-5 resultou em benefícios sensoriais aos produtos, uma vez que as características sensoriais dos queijos T2 e T3 mantiveram-se estáveis entre 7 e 14 dias de armazenamento. A análise estatística indicou que T2 e T3 mantiveram-se estáveis, com boa aceitação após 7 e 14 dias de armazenamento, enquanto que o queijo controle obteve menor aceitação quando comparado após 7 e 14 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

❖ A suplementação de queijo minas frescal com *Lactobacillus acidophilus* La-5, isoladamente ou em co-cultura com uma cultura *starter* termofílica (*S. thermophilus*), resultou em um produto potencialmente funcional, com populações acima do mínimo requerido para um produto probiótico (particularmente quando produzido com leite com um teor reduzido de gordura), apresentando propriedades sensoriais, microbiológicas, físico-químicas e de textura adequadas e superiores aos queijos produzidos somente com acidificação direta do leite com ácido láctico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Resolução RDC nº145 de 13 dez de 1996. Dispõe sobre regulamento técnico mercosul de identidade e qualidade de queijo minas frescal. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/145_96.htm. Acesso em: 16 jan 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em 30 maio 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas de 11 de janeiro de 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/teco_lista_alega.htm. Acesso em: 18 de jan. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Recomendações da comissão de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/teco.htm>. Acesso em: 30 de maio 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência de produtos especiais. Probióticos [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por cinthiahoch@yahoo.com.br em 17 de fev. de 2006.

AHMED, N.H.; EL SODA, M.; HASSAN, A.N.; FRANK, J. Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. **LWT: Food Science and Technology**, v.38, n.8, p.843-847, 2005.

AIGSTER, A.; SIMS, C.; STAPLES, C.; SCHIMIDT, R.; O'KEEFE, S.F. Comparison of cheese made from milk having normal and high oleic fatty acid compositions. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p.920-924, 2000.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v.12, p.201-208, 2002.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.4, p.200-206, 2005.

ALEGRO, J.H.A. **Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. São Paulo, 2003. 84p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ALEGRO, J.H.A.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura de queijos Minas frescal contendo *L. acidophilus* e *B. lactis* isolados ou em co-cultura. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.61, 2002. res.ALN41. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002a).

ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in Minas frescal cheese. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 7, Santiago, 2002b. 1CD.

ALIZADEH, M.; HAMED, M.; KHOSROSHAHI, A. Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese. **Food Chemistry**, v.97, p.294-301, 2006.

ALMEIDA, K.M.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.

AYHAN, K.; DURLU-ÖZKAYA, F.D.; TUNAIL, N. K. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.3, p.150-157, 2005.

BALDINI, V.L.S. **Proteólise em queijo tipo Prato durante a maturação**. São Paulo, 1998. 208p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BANKS, J.M. The technology of low-fat cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.4, p.199-207, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 2001. 401p.

BERGAMINI, C.V; HYNES, E.R; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V.B.; ZALAZAR, C.A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v.38, p.597-604, 2005.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

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.

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

BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2.

BURITI, F.C.A. **Viabilidade de obtenção de queijo fresco cremoso simbiótico**. São Paulo, 2005. 75p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BURITI, F.C.A.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Perfil de textura e avaliação sensorial de queijo Minas frescal processado com a adição de uma co-cultura probiótica. In: **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.37, supl.1, p.41, 2001. res. ALN41. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 6, São Paulo, 2001).

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

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.15, p.1279-1288, 2005b.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. São Paulo: Artmed, 2003. p.153-164.

CARMINATI, D.; PERRONE, A.; NEVIANI, E. Inhibition of *Clostridium sporogenes* growth in mascarpone cheese by co-inoculation with *Streptococcus thermophilus* under conditions of temperature abuse. **Food Microbiology**, v.18, p.571-579, 2001.

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

CHUMCHALOVÁ, J.; JOSEPHEN, J.; PLOCKOVÁ, M. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO₃ and lysozyme. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.33-38, 1998.

CICHOSCKI, A.J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A.T.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v.13, p.329-336, 2002.

COCONNIER, M.H.; BERNET, M. F.; CHAUVIERE, G.; SERVIN, A.L. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v.11, p.253-242, 1993.

COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.451-460, 2004.

CORBO, M.R.; ALBENZIO, M.; DE ANGELIS, M.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.551-561, 2001.

CUNHA, C.R.; VIOTTO, W.H.; VIOTTO, L.A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v.16, p.215-224, 2006.

DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLEMARD, J.C. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1081-1091, 1999.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DERAZ, S.F.; KARLSSON, E.N.; HEDSTRÖM, M; ANDERSSON, M.M.; MATTIASSON, B. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology**, v.117, p.343-354, 2005.

DIÁRIO dos campos. <http://www.diariodoscampos.com.br/20060303/agri.htm>. Acesso em: 12 jan de 2006.

DILLON, V.M.; COOK, P.E. Biocontrol of undesirable microorganisms in food. In: DILLON, V.M., BOARD, R.G., eds. **Natural antimicrobial systems and food preservation**. Wallingford: CAB International, 1994. p.255-296.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.10, p.2854-2864, 1994.

DRAKE, M. A.; SWANSON, B.G. Reduced and low-fat cheese technology: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.366-369, 1995.

DROUVAULT, S.; ANBA, J.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.938-941, 2002.

FARKYE, N. Y. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p.91-98, 2004.

FENELON, M.A.; BERESFORD, T.P.; GUINEE, T.P. Comparison of different bacterial culture systems for the production of reduced-fat Cheddar cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.4, p.194-203, 2002.

FERREIRA, V.L.P, coord. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: PROFÍQUA/SBCTA, 2000. p.117. (Série qualidade: manual).

FIGUEIREDO, H.M.; PASSOS, F.J.V.; MORAES, C.A.; PASSOS, F.M.L.; TEIXEIRA, M.A. Produção de leite não-fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 isolado no Brasil. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v.7, n.2, p.139-144, 2004.

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

FONTECHA, J.; CASTILLO, I; BLASCO, L; ALONSO, L; JUÁREZ, M. Effect of artisanal kid rennet paste on lipolysis in semi-hard goat cheese. **Food Chemistry**, v.98, p.253-259, 2006.

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**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

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

GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2192-2199, 1998.

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

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, v.2, n.9, p.125-134, 1999.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v.40, n.12, p.820-823, 1977.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, p.25-31, 2004.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.37-47, 1997.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, n.4, p.S203-S207, 1998.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.

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

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.6, p.1492-1507, 1998.

GONCU, A.; ALPKENT, Z. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. **International Dairy Journal**, v.15, p.771-776, 2005.

GORBACH, S.L. Probiotics and gastrointestinal health. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n.1, suppl., p.S2-S4, 2000.

GRUNDELIUS, A.U.; LODAITE, K.; ÖSTERGREN, K.; PAULSSON, M.; DEJMEK, P. Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. **International Dairy Journal**, v.10, p.489-496, 2000.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v.360, p.512-519, 2003.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yogurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**, v.93, p.783-786, 2005.

GUINARD, J.X.; MAZZUCHELLI, R. The sensory perception of texture and mouthfeel. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.213-219, 1996.

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

HAYNES, I.N.; PLAYNE, M. J. Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.10-14 (Abstr), 2002.

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

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.

HOLLINGSWORTH, P. Yogurt reinvents itself. **Food Technology**, v.55, n.3, p.43-49, 2001.

HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; DECARIS, B.; BOLOTIN, A.; DELORME, C.; EHRLICH, D.; GUÉDON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.435-463, 2005.

HUSSON-KAO, C.; MENGAUD, J.; GRIPON, J.C.; BENBADIS, L.; CHAPOT-CHARTIER, M.P. Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.209-213, 2000.

INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **Journal of Food Protection**, v.62, n.1, p.77-80, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IAL, 1985. p.207-208; p.232-234; p.237-238.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Fermented and non-fermented milk products. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Culture media. **Bulletin of the IDF 306**. Brussels: IDF, 1995. p.23-33.

ISEPON, J.S. **Variação do índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas frescal**. São Paulo, 1999. 110p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ITURRIRIA-LAVERTY, K.; TONG, P.S.; SANDERS, M.E. Microbiological stability of probiotic and starter bacteria in commercial yogurt and cottage cheese. **Journal of Dairy Science**, v.82 (Suppl.1):6 (Abstr.), 1999 *apud* SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.319-331, 2001.

IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, T.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.147-158, 1998.

JAIN P.K.; MCNAUGHT, C.E.; ANDERSON, A.D.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La 5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v.23, n.4, p.467-75, 2004.

JOHNSON, M.; LAW, B.A. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. p.1-32.

JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.2, p.293-296, 2001.

JURKIEWICZ, C.H. **Avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus***. São Paulo, 1999. 134p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KASIMOĞLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M.; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v.14, p.1067-1073, 2004.

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.

KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS, L.P.; KONDYLI, E. Improvement of sensory quality of low-fat Kefalograviera-type cheese with commercial adjunct cultures. **International Dairy Journal**, v.12, p.757-764, 2002.

KAVAS, G.; OYSUN, G.; KINIK, O.; UYSAL, H. Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. **Food Chemistry**, v.88, p.381-388, 2004.

KAYROOZ, K.; MOY, T.F.; YANEK, L.R.; BECKER, D.M. Dietary fat patterns in urban african american women. **Journal of Community Health**, v.23, n.6, p.453-469, 1998.

KHALID, N.M.; MARTH, E.H. Lactobacilli – Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2669-2684, 1990.

KONDYLI, E.; MASSOURAS, T.; KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS, L.P. Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures. **International Dairy Journal**, v.13, p.47-54, 2003.

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

LAW, J.; FITZGERALD, G.F.; UNIACKE-LOWE, T.; DALY, C.; FOX, P.F. The contribution of *Lactococcal* starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2455-2467, 1993.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of foods**: principles and practices. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p.

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

LEE, S.K.; KLOSTERMEYER, H. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.34, n.5, p.288-292, 2001.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1-17, 2001.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, p.751-759, 2004.

MACEDO, A.C.; TAVARES, T.G.; MALCATA, F.X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v.21, n.2; p.233-240, 2004.

MARSHALL, R.T., ed. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 546p.

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo petii-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2; p.386-393, 2006.

MATER, D.D.G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M.J.; MOGENET. A.; BRESSON, J.L.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p.185-187, 2005.

MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J.A.; GODÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Effects of *Lactobacillus* strain on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.37-46, 2000.

MICHAELIDOU, A.; KATSIARI, M.C.; KONDYLI, E.; VOUTSINAS, L.P; ALICHANIDIS, E. Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. **International Dairy Journal**, v.13, p.179-189, 2003.

MICHETTI, P.; DORTA, G.; WIESEL, P.H.; BRASSART, D.; VERDU, E.; HERRANZ, M.; FELLE, C.; PORTA, N.; ROUVET, M.; BLUM, A.L.; CORTHESEY-THEULAZ, I. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. **Digestion**, v.60, p.203-209, 1999.

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.

MORENO, I. **Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo Prato**. São Paulo, 2003. 173p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

NEAVES, P.; WILLIAMS, A.P. Microbiological surveillance and control in cheese manufacture. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. p.251-280.

NEVES-SOUZA, R.D.; SILVA, R.S.S.F. Estudo de custo-rendimento do processamento de queijos tipo minas frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.170-174, 2005.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do sistema digestivo. **Revista Ciência Hoje**, v.28, n.163, p.34-38, 2000.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, F.J.; VIEIRA, L.Q.; RODRIGUES, A.C.P.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M.; LIMA FILHO, J.V.M.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; MACHADO, D.C.C. Probióticos: experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F., ed. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.123-133.

NOGUEIRA, M.C.L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S.A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT: Food Science and Technology**, v.38, n.5, p.555-563, 2005.

OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Microbiological profile of probiotic minas cheese. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.389, res.AL-091.

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.

O'MAHONY, M. **Sensory evaluation of food: statistical methods and procedures**. New York: Marcel Dekker, 1986. 487 p.

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

PIDCOCK, K.; HEARD, G.M.; HENRIKSSON, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.75-81, 2002.

PRIETO, B.; FRANCO, I.; FRESNO, J.M.; PRIETO, J.G.; BERNARDO, A.; CARBALLO, J. Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. **Food Chemistry**, v. 85, p.389-398, 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.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

RASTALL, R.A.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.490-496, 2002.

REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.37, n.2, p.105-118, 2003.

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

ROCHA, J.S; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.263-272, 2006.

ROY, D.; MAINVILE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. **International Dairy Journal**, v.7, p.785-793, 1997.

RUDAN, M.A.; BARBANO, D.M.; YUN, J.J.; KINDSTEDT, P.S. Effect of fat reduction on chemical composition, proteolysis, functionality, and yield of mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.661-672, 1999.

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.

RYHÄNEN, E.L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v.11, p.441-447, 2001.

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.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A., eds. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.319-331, 2001.

SCHIMIDT-HEBBEL, H. Alimentos proteicos: queso. In: SCHIMIDT-HEBBEL, H. Química y tecnología de los alimentos. Santiago do Chile: Salesiana, p.52-56, 1956.

SCHKODA, P.; HECHLER, A.; KESSLER, H.G. Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels. **International Dairy Journal**, v.9, p.269-273, 1999.

SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17, n.5, p.741-754, 2003.

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

SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.10, p.401-408, 2000.

SHIROSE, I.; MORI, E.E.M. **Estatística aplicada à análise sensorial: módulo 1**. Campinas: ITAL, 1994. 73p. (Manual Técnico, n.13).

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

SPENCE, A.P. **Anatomia Humana Básica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. 713p.

STAMPANONI, C.R.; NOBLE, A.C. The influence of fat and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs. A scalar study. **Journal of Texture Studies**, v.22, p.367-380, 1991.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-497, 1998.

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.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific, 1999. p.57-64.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.35-60.

THAGE, B.V, BROE, M.L; PETERSEN, M.H; PETERSEN, M.A; BENNEDSEN, M. A; ARDÖ, Y. Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. **International Dairy Journal**, v.15, p.795-805, 2005.

TUNICK, M.H.; COOKE, P.H.; MALIN, E.L.; SMITH, P.W.; HOLSINGER, V.H. Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese during storage. **International Dairy Journal**, v.7, p.149-155, 1997.

VALERIO, F.; LAVERMICOCCA, P.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, p.289-295, 2004.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v.33, p.97-102, 2000a.

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

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.

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

VOROBYEVA, N.V. Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water. **Medical Hypotheses**, v.64, p.543-546, 2005.

YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.261-269, 2003.

YILMAZ, G.; AYAR, A.; AKIN, N. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.269-274, 2005.

YOUNG, R.J.; HUFFMAN, S. Probiotic use in children. **Journal of Pediatric Health Care**, v.17, n.6, p.277-283, 2003.

WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1965-1979, 1990.

WANG, K.Y.; LI, S.N.; LIU, C.S.; PERNG, D.S.; SU, Y.C.; WU, D.C.; JAN, C.M.; LAI, C.H.; WANG, T.N.; WANG, W.M. Effects of ingesting *Lactobacillus* - and *Bifidobacterium* - containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.3, p.737-741, 2004.

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

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

ZISU, B.; SHAH, N.P. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3405-3415, 2003.

ANEXO I: Preparação do ágar MRS-IM para *Lactobacillus acidophilus* (de acordo com Christian Hansen).

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Tween 80	1,0 g
Dipotássio hidrogenofosfato	2,6 g
Sódio acetato trihidrato	5,0 g
Di-amônio hidrogeno citrato	2,0 g
Magnésio sulfato heptahidrato	0,2 g
Manganês (II) sulfato monohidrato	0,05 g
Ágar bacteriológico	13,0 g

Suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada. Ferver o meio até dissolução total. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfriar a 47°C+1°C e adicionar 100 mL de solução de maltose a 20% estéril.

ANEXO II: Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Protocolo nº067/2004).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº-067/2004

São Paulo, 04 de agosto de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Cíntia Hoch Batista de Souza

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 02 de agosto p.p., **APROVOU** o projeto "Influência de uma cultura termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo Minas frescal probiótico" (Protocolo nº 249) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dr.ª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP,

Orientador: Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT

ANEXO III: Modelo de ficha utilizada na análise sensorial.

Nome:.....**Data:**.../.../....

Você está recebendo uma amostra de queijo Minas frescal. Por favor, prove a amostra, e em seguida, avalie usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Por favor, tome um pouco de água entre a degustação das amostras.

- 1 - Desgostei muitíssimo
- 2 - Desgostei muito
- 3 - Desgostei regularmente
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 5 - Não gostei nem desgostei
- 6 - Gostei ligeiramente
- 7 - Gostei regularmente
- 8 - Gostei muito
- 9 - Gostei muitíssimo

Amostra	Valor
119	

O que você mais gostou na amostra?.....

O que você menos gostou na amostra?.....

Comentários:.....
.....

Obrigada pela sua participação!!!

ANEXO IV: Modelo de ficha utilizada no recrutamento de provedores para análise sensorial.

Recrutamento de provadores para análise sensorial de alimentos

Estamos convidando você para participar de uma análise sensorial de queijo Minas frescal.

Esta análise é parte integrante do projeto de mestrado da aluna Cíntia Hoch Batista de Souza e será conduzida com o auxílio da aluna de mestrado Flávia Carolina Alonso Buriti, sob orientação da Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP.

O produto a ser avaliado apresenta os seguintes ingredientes:

Leite pasteurizado e homogeneizado tipo B, fermento láctico (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*), ácido láctico, cloreto de cálcio, coalho, soro e sal.

O produto foi elaborado e acondicionado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP.

Nessa análise o provador deverá provar 3 amostras de queijo Minas frescal e avaliar a aceitação de cada produto. O teste será conduzido no laboratório de Análise Sensorial do Bloco 16. Não haverá remuneração financeira. Todas as informações serão sigilosas, garantindo a privacidade do provador.

Portanto, se você quiser participar dessa análise, favor preencher as informações do Termo de Compromisso abaixo:

Estou ciente do objetivo do teste, não apresento reação alérgica ou intolerância aos ingredientes, e aceito participar dessa análise sem restrições.

ANEXO V: Normas Específicas da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.



Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)