

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico

Flávia Carolina Alonso Buriti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo
2005

Flávia Carolina Alonso Buriti

Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 2005.

Para minha mãe e grande amiga Hilária,
pela dedicação, carinho e incentivo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz e força concedida a todo o momento, ajudando-me a realizar este trabalho com grande prazer e a alcançar bons resultados.

A minha orientadora Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad pelos ensinamentos, pela enorme confiança em meu trabalho, pelas realizações obtidas graças a essa parceria e a todos os colegas que fizeram e fazem parte de seu grupo de pesquisa.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Tullia Maria Clara Caterina Filisetti pela fundamental colaboração a esse trabalho.

À Profa. Dra. Inar Alves de Castro pelas valiosas sugestões na condução da análise sensorial e a todos os provadores participantes.

Ao Centro de Estatística Aplicada do Instituto de Matemática e Estatística – USP e, em especial, à Profa. Dra. Júlia Maria Pavan Soler e ao aluno de bacharelado em estatística Afonso Massao Yamaguchi pela realização da análise estatística dos resultados aqui apresentados.

Aos professores, pesquisadores, funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF – USP, em particular, aos Laboratórios de Análise de Alimentos, Microbiologia e Química e Bioquímica.

À bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros pelo auxílio na correção das referências apresentadas neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e auxílio financeiro concedidos. À Coordenadoria de Assistência Social da Universidade de São Paulo (COSEAS) pela bolsa moradia.

Às empresas Xandô, Danisco, Rhodia, Orafiti, Clariant, Novozymes, Purac Sínteses e 3M Microbiology que colaboraram com parte dos recursos materiais aqui utilizados.

À Faculdade de Saúde Pública – USP pela minha formação e aos colegas que ali conheci.

A meus familiares e amigos pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Alimentos funcionais	1
1.2. Probióticos – mecanismos de ação, efeitos benéficos, viabilidade e fatores relacionados.....	2
1.3. Grupo <i>Lactobacillus casei</i>	4
1.4. Prebióticos – definição e efeitos benéficos	6
1.5. Inulina e oligofrutose	6
1.6. Efeitos sinérgicos de pré e probióticos e os alimentos simbióticos.....	8
1.7. Queijo como veículo de probióticos e a possibilidade de transformá-lo em alimento simbiótico.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Ensaio piloto para o desenvolvimento do produto	11
3.1.1. Elaboração dos queijos.....	11
3.1.2. Queijos probióticos e simbióticos produzidos nas condições inicialmente propostas – ensaios 1 a 4	12
3.1.3. Ensaio 5 a 8 (substituição do leite).....	15
3.1.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos.....	17
3.1.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento	18
3.1.6. Determinação dos parâmetros físico-químicos	18
3.2. Ensaio definitivo.....	19
3.2.1. Elaboração dos queijos	19
3.2.2. Armazenamento e períodos de amostragem	21
3.2.3. Determinação dos parâmetros microbiológicos.....	22
3.2.4. Determinações de parâmetros microbiológicos adicionais.....	23

3.2.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento	23
3.2.6. Determinação da textura instrumental.....	24
3.2.7. Determinação dos parâmetros físico-químicos	24
3.2.8. Determinação quantitativa de açúcares e de frutanos	25
3.2.9. Delineamento experimental e análise estatística	26
3.2.10. Análise sensorial	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Ensaio pilotos	28
4.1.1. Ensaio 1 e 2.....	28
4.1.2. Ensaio 3 e 4.....	30
4.1.3. Ensaio 5 a 8.....	31
4.2. Ensaio definitivos.....	34
4.2.1. Parâmetros físico-químicos.....	34
4.2.2. Parâmetros microbiológicos – microrganismos “starter” e probiótico	37
4.2.3. Parâmetros microbiológicos – microrganismos indicadores de contaminação e bactérias lácticas	41
4.2.4. Textura instrumental.....	49
4.2.5. Determinação de açúcares e de frutanos.....	53
4.2.6. Análise sensorial	55
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXO 1 – Aprovação da análise sensorial do presente trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP	70
ANEXO 2 – Resultados da análise estatística para os microrganismos indicadores de contaminação	72
ANEXO 3 – Modelo da ficha utilizada na análise sensorial	73
ANEXO 4 – Modelo da ficha utilizada para recrutamento dos participantes da análise sensorial	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção de ingredientes utilizados nas formulações dos queijos nos ensaios pilotos 1 e 2	13
Tabela 2: Variáveis envolvidas na elaboração dos queijos dos ensaios pilotos 5 a 8.....	15
Tabela 3: Proporção de ingredientes utilizados nas formulações dos queijos nos ensaios 5 a 8.	16
Tabela 4: Variáveis envolvidas na elaboração dos queijos produzidos nos ensaios definitivos.....	20
Tabela 5: Proporção de ingredientes utilizados nos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).	21
Tabela 6: pH e análises microbiológicas realizadas nos leites utilizados para os ensaios 1 e 2.	28
Tabela 7: Análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nos queijos em processamento e nos produtos finais dos ensaios 1 e 2.	29
Tabela 8: Análises realizadas no leite e queijo em processamento dos ensaios 3 e 4.....	30
Tabela 9: Análises físico-químicas e microbiológicas realizadas no leite, queijo em processamento e produto final após 1, 7 e 14 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ dos ensaios 5 a 8.....	32
Tabela 10: Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	34
Tabela 11: Teor de gordura, proteína, cinzas e carboidratos totais (média \pm desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) no produto final – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT) – após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	36
Tabela 12: Contagens de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média \pm desvio-padrão) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	38
Tabela 13: Contagens de <i>Lactobacillus paracasei</i> (média \pm desvio-padrão) obtidas para os queijos T1 (probiótico) e T2 (simbiótico) na massa-base de queijo fresco	

(dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	39
Tabela 14: Parâmetros microbiológicos dos leites utilizados para a elaboração dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).....	41
Tabela 15: Contagens de coliformes totais (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	43
Tabela 16: Contagens de <i>Staphylococcus</i> spp. (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	44
Tabela 17: Contagens de <i>Staphylococcus</i> DNase positivos obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	45
Tabela 18: Contagens de bolores e leveduras (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	46
Tabela 19: Contagens de bactérias lácticas (médias de 5 ensaios) obtidas para os queijos T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	46
Tabela 20: Perfil de textura (média \pm desvio-padrão) dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	50
Tabela 21: Teor de frutanos e açúcares obtidos para a inulina Raftiline® HP-Gel e para as amostras de queijo T2 (simbiótico), congeladas após 1 e 21 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	54
Tabela 22: Distribuição das notas de acordo com a preferência dos provadores (n=44) na análise sensorial dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).....	55
Tabela 23: Atributos sensoriais que contribuíram para a preferência dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na opinião dos provadores.....	56
Tabela 24: Atributos sensoriais que contribuíram para a menor preferência dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na opinião dos provadores.....	56

Tabela A.1: Teste binomial exato para a proporção de contagens de coliformes totais, *Staphylococcus* DNase positivos e bolores e leveduras acima do limite de sensibilidade de medição obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, considerando $p < 0,05$.
..... 72

Tabela A.2: Teste binomial exato para a proporção de contagens de *Staphylococcus* spp. acima do limite de sensibilidade de medição obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, considerando $p < 0,05$ 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma contendo as principais etapas de produção dos queijos dos ensaios pilotos mais relevantes elaborados neste trabalho. 12

Figura 2: Fluxograma contendo as principais etapas de produção dos queijos dos ensaios definitivos elaborados neste trabalho. 19

Figura 3: Teor de gordura do leite e respectivos produtos finais, queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle), após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 37

Figura 4: Gráfico da análise do perfil de textura obtido para o queijo T2 (simbiótico), após 1 dia de fabricação. 49

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Prebióticos são carboidratos não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Um produto referido como simbiótico é aquele no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. O presente trabalho visou estudar a viabilidade da obtenção de queijo fresco cremoso simbiótico processado com a adição de uma cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82) e do ingrediente prebiótico inulina.

Três tratamentos de queijo fresco cremoso foram produzidos (5 repetições de cada um): T1 (probiótico) - com *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus paracasei*; T2 (simbiótico) - com *St. thermophilus* + *L. paracasei* + inulina; T3 (controle) - somente com *St. thermophilus*. As contagens de *L. paracasei*, *St. thermophilus*, bactérias lácticas, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* DNase positivos, bolores e leveduras e as análises de pH, acidez titulável, umidade, atividade de água e perfil de textura (dupla compressão, em analisador de textura TA-XT2), além da determinação do teor de frutanos dos queijos T2, foram realizadas até 21 dias de armazenamento dos produtos a 4 ± 1 °C. Os queijos também foram comparados através de avaliação sensorial após 7 dias de armazenamento, empregando-se o teste de ordenação-preferência.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os queijos T1, T2 e T3 para acidez titulável, umidade e atividade de água ($p > 0,05$). As contagens de *St. thermophilus* permaneceram constantes, próximas a $9,5 \log$ ufc/g, em T1, T2 e T3. A viabilidade de *L. paracasei* foi suficiente para caracterizar os queijos T1 e T2 como potencialmente probióticos, apresentando populações sempre acima de $7 \log$ ufc/g. Os níveis de contaminação estiveram sempre abaixo dos limites exigidos pela legislação brasileira (exceto para *Staphylococcus* DNase positivos em uma amostra dos queijos T3 ao 1º dia) e *E. coli* não foi detectado.

A presença de inulina nos queijos T2 não alterou significativamente o perfil de textura ($p > 0,05$). Não houve variação significativa no teor de frutanos dos queijos T2 durante o armazenamento ($p > 0,05$), permanecendo sempre superior a 7g / 100g. Os queijos T1 apresentaram a menor preferência na análise sensorial e diferiram significativamente de T2 e T3 ($p < 0,05$), devido ao sabor ácido, de acordo com os provadores. Por outro lado, T2 foi o preferido, porém, não diferindo significativamente de T3 ($p > 0,05$). A adição de inulina ao queijo fresco cremoso produzido com a adição de uma cepa potencialmente probiótica de *Lactobacillus paracasei* resultou em um produto com características adequadas e com propriedades funcionais agregadas.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. Prebiotics are nondigestible carbohydrates that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and/or activity of a limited number of bacteria present in the colon. A product referred as synbiotic is one in which probiotics and prebiotics are combined. The present research aimed to study the viability of obtaining a synbiotic fresh cream cheese produced with the addition of a probiotic culture of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82) and of the prebiotic ingredient inulin.

Three fresh cream cheese-making trials were produced (5 repetitions of each one): T1 (probiotic) – with *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus paracasei*; T2 (synbiotic) – with *St. thermophilus* + *L. paracasei* + inulin; T3 (control) – only with *St. thermophilus*. Counts of *L. paracasei*, *St. thermophilus*, lactic acid bacteria, coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., DNase-positive *Staphylococcus*, yeasts and moulds, and analysis of pH, titratable acidity, moisture content, water activity and texture profile (two-bite compression tests, employing a TA-XT2 texture analyser), besides determination of fructan content in cheeses T2, proceeded up to 21 days of storage of the products at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Cheeses were also compared through sensory evaluation after 7 days of storage, using preference-ranking test.

No significant differences were detected between cheeses T1, T2 and T3 for titratable acidity, moisture content and water activity ($P>0.05$). Counts of *St. thermophilus* remained constant, around $9.5 \log \text{cfu/g}$, in cheeses T1, T2 and T3. Viability of *L. paracasei* was enough to characterize cheeses T1 and T2 as potentially probiotic, and counts were always above $7 \log \text{cfu/g}$. Contamination levels were always below the recommended by Brazilian regulatory standards (except for a DNase positive *Staphylococcus* sample of cheeses T3 at day 1), and *E. coli* was never detected. *L. paracasei* inhibited the growth of coliforms, *Staphylococcus* spp. and DNase-positive *Staphylococcus* significantly ($P<0.05$) in cheeses T1 and T2.

The presence of inulin in cheeses T2 did not alter the texture profile significantly ($P>0.05$). No significant changes in the fructan content during storage were observed ($P>0.05$), and it remained always above $7 \text{ g} / 100 \text{ g}$. Cheeses T1 were the least preferred in the sensory evaluation and differed significantly from T2 and T3 ($P<0.05$), due to acidic taste, according to panelists. On the other hand, T2 was the most preferred one, though not significantly different from T3 ($P>0.05$). The addition of the prebiotic ingredient inulin to fresh cream cheese produced with a potentially probiotic *Lactobacillus paracasei* strain resulted in a product with appropriate features and with aggregated functional properties.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alimentos funcionais

Além de prover nutrição, a alimentação também pode modular várias funções no corpo humano que são relevantes à saúde (ROBERFROID, 1999a). A saúde pública freqüentemente utiliza-se da alimentação como estratégia de manutenção da saúde, estratégia esta voltada à prevenção do início precoce de desordens gastrintestinais, doenças crônicas como doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose, bem como a promoção de um envelhecimento mais saudável (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Considera-se que a dieta pode possuir um desempenho significativo se contribuir para a modulação de várias funções do organismo (KORHONEN, 2002). O conceito de nutrição enfatiza o uso promissor dos alimentos para promover o bem-estar, a melhor saúde e a redução do risco de doenças, conceitos que se tornaram populares entre os consumidores (ROBERFROID, 1999a).

Os consumidores estão mais informados e conscientes sobre assuntos ligados à alimentação e à saúde. Assim, eles estão interessados em alimentos que provêm benefícios à saúde e esperam que esses alimentos sejam convenientes, acessíveis e com sabor agradável (NINESS, 1999).

O aumento da demanda por alimentos “saudáveis” está estimulando inovações e o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos mundial (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Com as evidências crescentes dos efeitos benéficos de certos componentes bioativos do leite e de ingredientes desejáveis específicos adicionados aos produtos lácteos, o mercado desses alimentos está se tornando o maior condutor da indústria de laticínios internacional (JELEN & LUTZ, 1998). Os alimentos funcionais são definidos como quaisquer alimentos ou ingredientes alimentares capazes de promover benefícios à saúde além de possuírem os nutrientes já tradicionais (HALSTED, 2003). Essa promoção se dá por mecanismo não previsto pela nutrição convencional (SANDERS, 1998).

A suplementação de componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Posteriormente, esse conceito voltou-se principalmente para aditivos

alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal - os probióticos e os prebióticos (ZIEMER & GIBSON, 1998).

1.2. Probióticos – mecanismos de ação, efeitos benéficos, viabilidade e fatores relacionados

A microbiota intestinal é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal. A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos (ISOLAURI *et al.*, 2004). O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON & FULLER, 2000).

Segundo CRITTENDEN (1999), é possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal (TGI) através da introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de suplemento alimentar prebiótico, que vai modificar seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema.

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; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). 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).

FULLER (1989) enumerou três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos: i) a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e por sítios de adesão; ii) a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática; iii) o estímulo da imunidade do

hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

Um microrganismo probiótico deve sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino (ZIEMER & GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999). A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; aumento da absorção de minerais; produção de vitaminas; alívio da constipação; redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; estimulação do sistema imune; prevenção de infecções urogenitais; efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade; efeitos anti-carcinogênicos – como a redução do risco de câncer de cólon; diminuição do risco de doença cardiovascular; redução dos níveis séricos de colesterol; efeitos anti-hipertensivos (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; CHARTERIS *et al.*, 1998; JELEN & LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; TUOHY *et al.*, 2003).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence a bactéria ser de origem humana, a estabilidade frente a ácido e a bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Ainda inclui a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não devem estar associadas a outras doenças tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos. Tais bactérias têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrintestinal do humano saudável, possuindo efeito protetor. 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). Entretanto, deve ser salientado 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).

Uma seleção adequada de cepas deve ser conduzida para o processamento de produtos lácteos probióticos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003). A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas, tipicamente acima de 10^6 unidades formadoras de colônias (ufc)/ml para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN & LUTZ, 1998). O consumo de quantidades adequadas dos microrganismos probióticos desejados nos bioprodutos (10^9 a 10^{10} ufc/100g de produto) são suficientes para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 ufc/g) *in vivo* (CHARTERIS *et al.*, 1998).

Produtos de leite fermentado contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são um grupo de bioprodutos microbiologicamente sensíveis. Em particular, a viabilidade dos membros de ambas as espécies de microrganismos diminui marcadamente durante o armazenamento refrigerado, particularmente devido ao baixo pH do produto (CHARTERIS *et al.*, 1998). No trato gastrintestinal, por sua vez, os efeitos da presença de bifidobactéria são dependentes da sua viabilidade e atividade metabólica, sendo potencializados pela presença de carboidratos complexos e de fatores bifidogênicos, também denominados prebióticos (JELEN & LUTZ, 1998).

1.3. Grupo *Lactobacillus casei*

O grupo *Lactobacillus casei* compreende bactérias lácticas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, envolvendo as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* e *Lactobacillus rhamnosus*, que são lactobacilos homofermentativos tipicamente do hospedeiro humano (FELIS *et al.*

2001; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). As espécies *Lactobacillus casei* / *paracasei* têm sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo freqüentemente empregadas como probióticos ou em culturas mistas nas indústrias de alimentos (STILES & HOLZAPFEL, 1997; STANTON, 1998; FELIS *et al.*, 2001; ITSARANUWAT *et al.*, 2003; MEDICI *et al.*, 2004).

Vários tipos de alimentos têm sido estudados como veículo para a incorporação de cepas do grupo *Lactobacillus casei*, entre os quais iogurtes e leites fermentados (KRISTO *et al.*, 2003), queijos (GARDINER *et al.*, 1998; VINDEROLA *et al.*, 2000; MENÉNDEZ *et al.*, 2000), produtos não lácteos e sem fermentação (HEENAN *et al.*, 2004) e frutas para aplicação em alimentos processados (KOURKOUTAS *et al.*, 2005).

Apesar da importância para a indústria de alimentos, a taxonomia do grupo *Lactobacillus casei* ainda permanece confusa (FELIS *et al.*, 2001). Os estudos de homologia de DNA realizados por COLLINS *et al.* (1989) ocasionaram a reclassificação da maioria das cepas referências de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* e *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* como *Lactobacillus paracasei*. Entretanto, vários autores, baseados em novos estudos de relacionamento filogenético, defendem a rejeição da denominação *Lactobacillus paracasei* em substituição pela antiga nomenclatura (DICKS *et al.*, 1996; FELIS *et al.*, 2001; DELLAGLIO *et al.*, 2002).

Vários trabalhos foram conduzidos para melhor caracterizar os efeitos funcionais *in vivo* de cepas pertencentes ao grupo *Lactobacillus casei*. Os efeitos atribuídos especificamente a essas bactérias estão relacionados à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos (CANO & PERDIGÓN, 2003), ativação das imunidades local e sistêmica (HORI *et al.*, 2002), redução dos sinais clínicos de diarreia por rotavírus (GUÉRIN-DANAN *et al.*, 2001), diminuição da fermentação proteolítica intestinal (GUERIN-DANAN *et al.*, 1998), diminuição dos níveis de triglicérides séricos e colesterol (MINELLI *et al.*, 2004) e redução do risco de câncer (OUWEHAND *et al.*, 1999; ITSARUNUWAT *et al.*, 2003).

1.4. Prebióticos – definição e efeitos benéficos

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que chegam ao cólon e estimulam seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis deste local (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Esses componentes atuam mais freqüentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto nos microrganismos do intestino delgado (GILLILAND, 2001).

Os ingredientes dos alimentos classificados como prebióticos geralmente exibem as seguintes características: limitada hidrólise e absorção no trato gastrintestinal superior; estimulação seletiva da multiplicação das bactérias benéficas no cólon; potencial para reprimir patógenos e limitar virulência por processos como a imunoestimulação e o estímulo da microbiota benéfica que promove a resistência à colonização por patógenos (KLAENHAMMER, 2001). Por outro lado, apesar da existência de evidências preliminares sobre o efeito hipotrigliceridêmico desses ingredientes, o mecanismo de ação dos prebióticos sobre o metabolismo lipídico de humanos ainda não foi elucidado (PEREIRA & GIBSON, 2002).

Os prebióticos compreendem alguns oligossacarídeos, especialmente fruto-oligossacarídeos, que preferencialmente promovem a multiplicação de bifidobactérias no intestino grosso (BIELECKA *et al.*, 2002). Através da alteração na composição gastrintestinal e no metabolismo, o prebiótico pode induzir efeitos sistêmicos benéficos à saúde (CRITTENDEN, 1999).

Dentre os prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os fruto-oligossacarídeos (FOS) como a oligofrutose. Os frutanos tipo inulina têm sido os mais investigados (FOOKS *et al.*, 1999; GILLILAND, 2001). Frutanos são oligo- ou polissacarídeos de frutose presentes em várias espécies vegetais como carboidratos de reserva (CÉRANTOLA *et al.*, 2004). Bifidobactérias fermentam seletivamente os frutanos, preferencialmente a outras fontes de carboidratos como o amido, a frutose, a pectina ou a polidextrose (FOOKS *et al.*, 1999).

1.5. Inulina e oligofrutose

A inulina e a oligofrutose têm sido denominadas prebióticos, por serem ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente a

multiplicação e/ou atividade de bifidobactérias na microbiota do cólon (ROBERFROID, 1999a; NINESS, 1999). As bifidobactérias podem hidrolisar estes frutanos e utilizá-los como fonte de energia para promover a sua multiplicação. A fermentação dessas fibras solúveis no intestino grosso resulta na produção de lactato e de ácidos carboxílicos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico), que são importantes para o metabolismo lipídico do hospedeiro (GILLILAND, 2001; ROBERFROID, 2002). Esses ingredientes são freqüentemente utilizados em combinação com probióticos, adicionados à alimentação do hospedeiro para promover a saúde, aumentando a sobrevivência, crescimento e implantação desses microrganismos (NINESS, 1999).

Alterações positivas na composição da microbiota intestinal foram demonstradas em estudos *in vivo* em humanos com doses entre 5 e 20 g por dia de inulina e/ou oligofrutose, geralmente com a administração durante um período de 15 dias (NINESS, 1999). De acordo com ROBERFROID (1999a), doses de 4 a 5 g por dia são eficientes para o estímulo da multiplicação das bifidobactérias.

Além da estimulação de *Bifidobacterium*, a inulina e a oligofrutose estão associadas a um aumento da freqüência de evacuações e volume fecal em pacientes constipados, à diminuição dos níveis séricos de triglicérides e colesterol em pacientes hipercolesterolêmicos, ao aumento da absorção e deposição de cálcio em humanos e à possível prevenção da osteoporose (NINESS, 1999; GREGER, 1999).

Por serem solúveis em água e não digeríveis pelas enzimas dos mamíferos, a inulina e a oligofrutose podem causar um ligeiro aumento no volume e algum aumento no peso seco do conteúdo intestinal do intestino delgado. Por sua dispersibilidade em água, a inulina e a oligofrutose podem ser prontamente degradadas por microrganismos presentes no intestino grosso (SCHNEEMAN, 1999). Decorrente a esse fato, a inulina e a oligofrutose, assim como todos os oligossacarídeos não digeríveis que são amplamente ou completamente fermentados no cólon, oferecem o valor calórico de 1,5 kcal/g, ou 6,3 kJ/g (ROBERFROID, 1999b). A fermentabilidade da inulina e da oligofrutose pode aumentar o peso fecal através do aumento da microbiota do cólon. Essa fermentação pode diminuir o pH do conteúdo do cólon (SCHNEEMAN, 1999). Em ratos alimentados com inulina e oligofrutose, a diminuição de pH no íleo, no ceco

e no cólon foi associada ao aumento da absorção de cálcio e magnésio (GREGER, 1999).

Os frutanos estão presentes em vários alimentos como trigo, banana, aspargo, alho, alho-poró, cebola, alcachofra de Jerusalém e chicória (ROBERFROID, 2000; KAUR & GUPTA, 2002). As principais fontes de inulina e oligofrutose empregadas na indústria de alimentos são a chicória (*Chicorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (CARABIN & FLAMM, 1999; KAUR & GUPTA, 2002). A inulina comercial, extraída com água quente das raízes dessas hortaliças, é composta, na sua forma nativa, por uma combinação de polímeros de frutose, cujo grau de polimerização varia de 3 a 60. A ligação química entre as unidades de frutose é β -1,2 (MURPHY, 2001). Foi aprovado pela AOAC um método para a análise de frutanos em alimentos, que inclui o tratamento das amostras com amiloglicosidase e inulinase, e a determinação dos açúcares por cromatografia de troca iônica – “Método Fructan” N.º 997.08 descrito em HOEBREGS (1997) - (RUPÉREZ & BRAVO, 2001). A inulina tem sido comercializada para uso em iogurtes probióticos e em outros laticínios (JELEN & LUTZ, 1998).

1.6. Efeitos sinérgicos de pré e probióticos e os alimentos simbióticos

A combinação de prebióticos e probióticos pode resultar em efeitos sinérgicos (NINESS, 1999). Um produto referido como simbiótico é aquele no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões “alvo” do trato gastrintestinal, os intestinos delgado e grosso (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles (BIELECKA *et al.*, 2002).

1.7. Queijo como veículo de probióticos e a possibilidade de transformá-lo em alimento simbiótico

O queijo é o produto fresco ou maturado resultante da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho (BRASIL, 1996). A primeira etapa de sua tecnologia de fabricação é a coagulação, lenta e depois rápida, do leite após o tratamento com enzimas coagulantes (quimosina, pepsina ou proteinases microbianas). A coagulação resulta de dois processos: i) o ataque da κ -caseína, responsável pela estabilização das micelas de caseína e ii) a agregação das micelas desestabilizadas. Um terceiro processo envolve as modificações das propriedades e da estrutura do coágulo após a sua formação (DALGLEISH, 1993).

A produção anual de queijos no Brasil aumentou de cerca de 195 mil toneladas em 1991 para cerca de 394 mil toneladas em 2001 e projetava-se um volume de 414 mil toneladas para o ano de 2002 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2002). A produção mundial desses produtos alimentícios é de cerca de 15 milhões de toneladas por ano, equivalendo a cerca de 35% da produção total de leite. Nos últimos 30 anos o incremento dessa taxa anual ocorreu próxima de 4% (FOX *et al.*, 2000). Apesar dos EUA e da União Européia representarem 80% do consumo mundial de queijo, o mercado brasileiro é considerado um mercado em franca expansão, assim como o japonês (JOHNSON & LAW, 1999).

Segundo JOHNSON & LAW (1999), as perspectivas de um incremento ainda maior nas vendas de queijo mundialmente, em particular no que diz respeito a valor agregado, surgem com o aumento da utilização desse produto como ingrediente alimentar e com o desenvolvimento de queijos mais saudáveis, através da fortificação com cálcio, da redução no teor de gordura, do aumento no teor de vitaminas através da adição de novas culturas e da adição de culturas probióticas.

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). Diversos tipos de queijo foram testados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, revelando-se apropriados, entre

eles, o Cheddar (DINAKAR & MISTRY, 1994; GARDINER *et al.*, 1998; Mc BREARTY *et al.*, 2001), Gouda (GOMES *et al.*, 1998), Cottage (BLANCHETTE *et al.*, 1996), Crescenza (GOBBETTI *et al.*, 1998), Árzúa-Ulloa (MENÉNDEZ *et al.*, 2000), queijo fresco cremoso (ROY *et al.*, 1997) e queijo fresco cremoso argentino (VINDEROLA *et al.*, 2000).

Tendo em vista o processo de produção de queijo fresco, um queijo não maturado e que é armazenado em temperaturas de refrigeração, tendo vida de prateleira bastante restrita, esse tipo de queijo é um veículo promissor para bactérias probióticas (HELLER *et al.*, 2003). A sobrevivência de bactérias probióticas em produtos como os queijos frescos é maior quando comparado aos queijos maturados. Os últimos apresentam condições que limitam a multiplicação daquelas bactérias, pois são armazenados por um período de tempo longo e possuem maior teor de sal, menor teor de umidade e menor atividade de água.

Em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o queijo Minas frescal mostrou-se um veículo apropriado para o emprego de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, e *Streptococcus termophilus* em co-cultura (OKAZAKI *et al.*, 2001; BURITI *et al.*, 2001), *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* individualmente e em co-cultura (ALEGRO *et al.*, 2002a,b), *Lactobacillus acidophilus* (BURITI *et al.*, no prelo; ROCHA *et al.*, 2002) e *Lactobacillus paracasei* (BURITI *et al.*, 2005). Os referidos microrganismos probióticos revelaram populações superiores ao mínimo requerido para efeito probiótico (10^6 ufc/g), ao longo de todo o período de armazenamento dos queijos em refrigeração de 21 dias. Resultados particularmente promissores foram obtidos para *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 (Rhodia), que revelou populações médias, respectivamente, após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento dos queijos a 5°C, de 6,61, de 6,88, de 7,69 e de 8,22 log ufc/g, nos queijos acidificados com ácido láctico, e de 6,79, de 7,50, de 8,15 e de 8,44, nos queijos acidificados com cultura láctica mesofílica do tipo O (BURITI *et al.*, 2005).

A viabilidade e a manutenção de concentrações adequadas dos microrganismos probióticos ao longo do armazenamento de queijo Minas frescal, resulta em boas perspectivas para elaboração de um novo produto - o queijo fresco cremoso, capaz de apresentar efeito probiótico *in vivo* (intestino delgado). A adição complementar de inulina, uma fibra alimentar solúvel que não confere sabor doce ao produto ao qual é adicionada e que atua como prebiótico, poderá

resultar em um queijo simbiótico em potencial. Dessa maneira, haveria a possibilidade de obtenção de um alimento funcional, que possibilitaria a administração de uma população razoável de bactérias probióticas para atuarem no intestino delgado do indivíduo e, ao mesmo tempo, o estímulo da multiplicação de bifidobactérias endógenas no cólon.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visou estudar a viabilidade da obtenção de queijo fresco cremoso simbiótico processado com a adição da cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 (Danisco) e do ingrediente prebiótico inulina (Raftline® HP-Gel, Orafiti), através da avaliação da sobrevivência do microrganismo probiótico, do teor de frutanos, das características microbiológicas, de textura e demais características físico-químicas do produto ao longo de seu período armazenamento em refrigeração, bem como de sua avaliação sensorial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ensaios pilotos para o desenvolvimento do produto

3.1.1. Elaboração dos queijos

A figura 1 ilustra, resumidamente, as principais etapas de fabricação dos ensaios pilotos mais relevantes realizados neste trabalho, no sentido de obter a formulação definitiva do produto estudado.

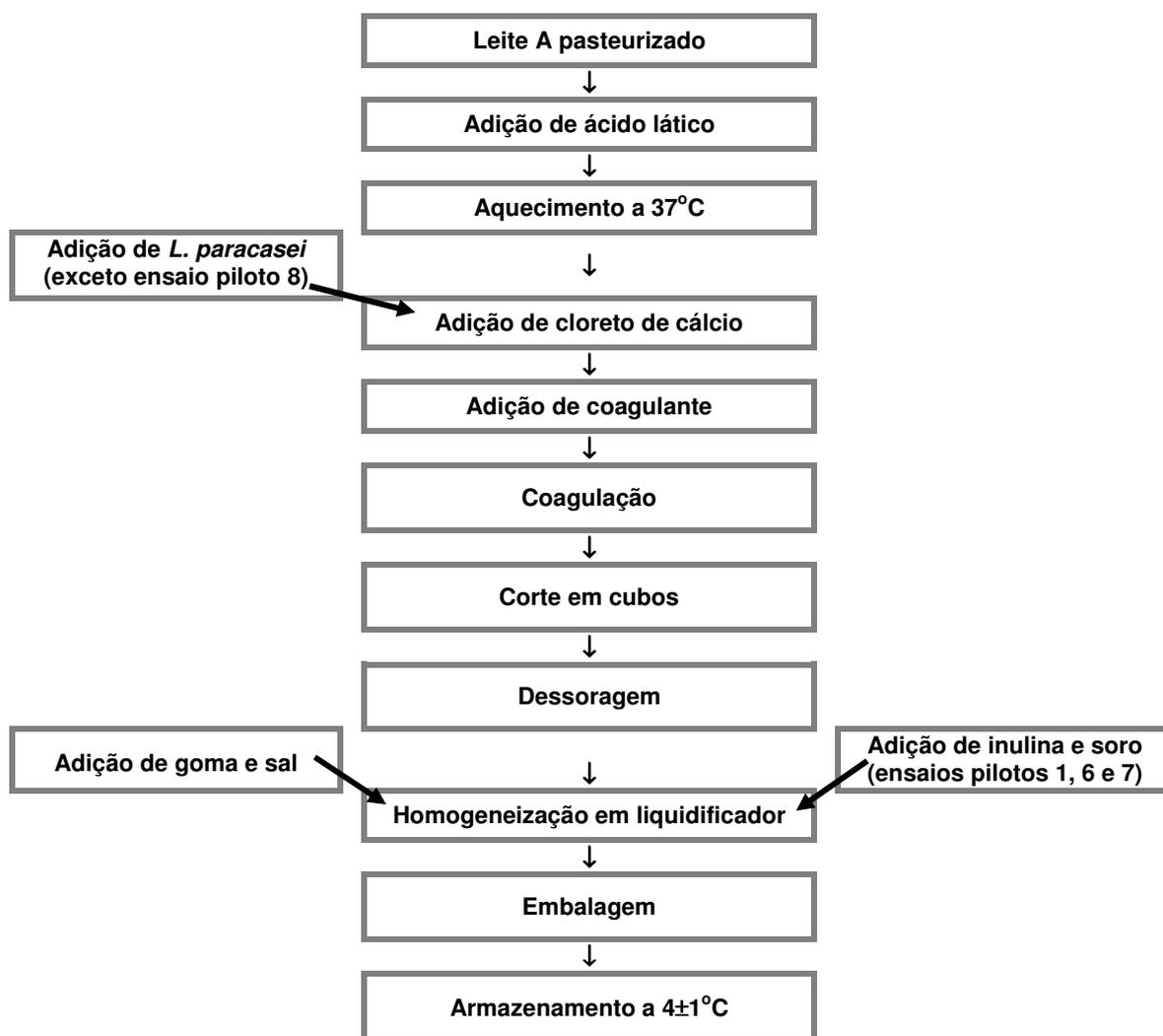


Figura 1: Fluxograma contendo as principais etapas de produção dos queijos dos ensaios pilotos mais relevantes elaborados neste trabalho.

3.1.2. Queijos probióticos e simbióticos produzidos nas condições inicialmente propostas (emprego de leite desnatado e acidificação direta) – ensaios 1 a 4

Foram realizados dois ensaios (1 e 2) para confirmar o comportamento dos queijos cremosos nas condições planejadas inicialmente. Cada queijo foi preparado a partir de 12 L de leite pasteurizado desnatado, 0,25% de gordura. Os queijos foram produzidos através de acidificação direta com ácido láctico (Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brasil, 0,25 mL/L de solução a 85%) mediante diluição prévia (1:10). Após aquecimento do leite a 36-37°C, a cultura probiótica liofilizada

do tipo DVS, composta de *Lactobacillus paracasei* (LBC 82, Danisco, Dangé, França) foi adicionada. A cultura liofilizada foi armazenada congelada. A sua adição ao leite na proporção de 10 mg/L. Também foram adicionados cloreto de cálcio (0,25 g/L) e coalho bovino em pó (Ha-la, Christian Hansen, Valinhos, Brasil, 10 mg/L). Os leites foram mantidos a 36°C até a sua coagulação. Após a coagulação, o coágulo formado foi cortado em cubos e dessorado em saco esterilizado de pano alvejado em estufa a 20°C por aproximadamente 2 horas. Imediatamente após a coagulação, parte do soro obtido no ensaio 1 foi acondicionado em frasco esterilizado com tampa e imediatamente refrigerado a 4±1°C. A massa de queijo resultante foi cortada (queijo em processamento) e acondicionada em béqueres esterilizados, coberta com filme de PVC, sob refrigeração a 4±1°C, até a etapa de homogeneização em liquidificador. Durante a homogeneização, uma pasta lisa e homogênea foi formada.

As proporções de ingredientes adicionados durante a homogeneização dos queijos dos ensaios 1 e 2 estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Proporção de ingredientes utilizados nas formulações dos queijos nos ensaios pilotos 1 e 2

Ingredientes	Proporção de ingredientes	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Massa base de queijo fresco	74,7%	98,7%
Inulina (Raftiline® HP-Gel, Orafti)	8%	–
Soro de queijo	16%	–
Sal	0,8%	0,8%
Goma xantana (Rhodigel 80, Rhodia)	0,5%	0,5%
Total	100%	100%

– = Sem adição.

Em ambos os ensaios, foram adicionados 0,8% de sal e 0,5% de goma xantana Rhodigel 80 (Rhodia, Melle, França), calculados de acordo com o rendimento final obtido para cada queijo. No caso do ensaio 1, a inulina Raftiline® HP-Gel (Orafti, Oreye, Bélgica), com grau de polimerização médio superior a 23, foi previamente dissolvida no soro de queijo aquecido a 55-60°C, na proporção

1:2 (uma parte de inulina para duas partes de soro)¹, e imediatamente incorporada à massa de queijo a ser homogeneizada.

O produto final foi acondicionado em potes individuais, contendo 40 g de queijo cada, selados com tampa metálica e armazenados sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Foram determinados o pH e as contagens de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e bactérias lácticas do leite utilizado para a produção dos queijos.

Na massa de queijo (queijo em processamento) foram realizadas as determinações de pH, umidade e das contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Lactobacillus paracasei*.

As determinações de pH, acidez livre, umidade, atividade de água, coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Lactobacillus paracasei* foram realizadas nos produtos finais (1 dia de armazenamento) dos ensaios 1 e 2.

Diante dos resultados, considerados indesejáveis, das análises microbiológicas obtidas nos ensaios 1 e 2, foi adquirido um novo lote de leite tipo A pasteurizado, 0,25% de gordura, do mesmo fabricante para a produção de queijo (ensaios 3 e 4), preparado com 4 vezes a quantidade de coagulante utilizada nos ensaios 1 e 2 (de 10 mg/L para 40 mg/L). Esse procedimento foi realizado no sentido de agilizar a coagulação e, desta forma, diminuir o tempo de exposição do queijo a temperaturas em que pode haver maior multiplicação de microrganismos. O tempo de dessoragem foi reduzido de duas para uma hora nos ensaios 3 e 4. As demais etapas de produção do queijo em processamento dos ensaios 3 e 4 seguiram àquelas empregadas nos ensaios 1 e 2. No leite utilizado e no queijo em processamento dos ensaios 3 e 4 foram determinados o pH e as contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e bactérias lácticas.

¹ Testes preliminares realizados no laboratório mostraram que a inulina Raftiline® HP-Gel apresenta melhor dissolução em leite ou soro aquecidos a uma temperatura entre 55 e 60°C.

3.1.3. Ensaios 5 a 8 (substituição do leite)

A partir do perfil microbiológico apresentado pelos ensaios pilotos 1 a 4, foi decidido substituir a marca de leite utilizada para a produção daqueles ensaios por outro leite com teor reduzido de gordura de um novo fornecedor, já que a qualidade da matéria prima influencia diretamente a qualidade do produto final, além de aumentar a quantidade de coagulante adicionado ao leite para agilizar a sua coagulação (40 mg/L) e diminuir o tempo de dessoragem (uma hora), reduzindo, portanto, o tempo de exposição do queijo a temperaturas em que pode haver maior multiplicação de microrganismos indesejáveis. Entretanto, não foi possível a obtenção de leite pasteurizado tipo A de um novo fornecedor com o mesmo teor de gordura que aquele utilizado anteriormente (0,25%). O novo leite adquirido apresentava teor médio de 1,5% de gordura (indicado na embalagem), portanto semi-desnatado (o leite pasteurizado tipo A integral do mesmo fornecedor apresentava teor médio de 3,4% de gordura – dados da embalagem).

Com as novas modificações foram realizados 4 novos ensaios (5 a 8) conforme apresentado na tabela 2:

Tabela 2: Variáveis envolvidas na elaboração dos queijos dos ensaios pilotos 5 a 8.

Ensaio	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Raftiline® HP-Gel
5	+	-
6	+	+
7	+	+
8	-	-

+ = Adição. - = Sem adição.

Os queijos foram preparados utilizando-se leite tipo A pasteurizado semi-desnatado, 1,5% de gordura, comercial Xandô (Fazenda Colorado, Araras, Brasil), 10 L para cada queijo. Os queijos foram produzidos através de acidificação direta com ácido láctico (Purac Sínteses, 0,25 mL/L de solução a 85%) mediante diluição prévia (1:10). Após aquecimento do leite à 36-37°C, a cultura probiótica composta de *Lactobacillus paracasei* (LBC 82, Danisco) foi adicionada nos ensaios 5 a 7. A sua adição ao leite foi feita na proporção de 10 mg/L. Também foram adicionados cloreto de cálcio (0,25 g/L) e coalho bovino em pó

(Ha-la, Christian Hansen, 40 mg/L). Os leites foram mantidos a 36°C até a sua coagulação. Após a coagulação, o coágulo formado foi cortado em cubos e dessorado em saco esterilizado de pano alvejado em estufa a 20°C por uma hora. Uma parte de cada soro obtido nos ensaios 6 e 7 foi acondicionada em frasco esterilizado com tampa e imediatamente refrigerada a 4±1°C. A massa de queijo resultante foi cortada e acondicionada em béqueres cobertos com filme de PVC, sob refrigeração a 4±1°C, até a etapa de homogeneização em liquidificador. As proporções de ingredientes adicionados durante a homogeneização dos queijos dos ensaios 5 a 8 estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Proporção de ingredientes utilizados nas formulações dos queijos nos ensaios 5 a 8.

Ingredientes	Proporção de ingredientes		
	Ensaio 5	Ensaio 6 e 7	Ensaio 8
Massa base de queijo fresco	98,7%	74,7%	98,7%
Inulina	–	8%	–
Soro de queijo	–	16%	–
Sal	0,8%	0,8%	0,8%
Goma xantana	0,5%	0,5%	0,5%
Total	100%	100%	100%

– = Sem adição.

No caso dos ensaios 6 e 7, a inulina Raftiline® HP-Gel (Orafti) foi previamente dissolvida no soro de queijo aquecido a 55-60°C, na proporção 1:2 (uma parte de inulina para duas partes de soro), e imediatamente incorporada à massa de queijo a ser homogeneizada.

O produto final foi acondicionado em potes individuais, contendo 40 g de queijo cada, selados com tampa metálica e armazenados sob refrigeração a 4±1°C por 14 dias.

Foram determinados o pH e as contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e bactérias lácticas do leite utilizado para a produção dos queijos.

No queijo em processamento dos ensaios 5 a 8 (antes da homogeneização em liquidificador com os demais ingredientes) foram realizadas as determinações de pH, umidade e das contagens de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus*

spp. A determinação de bactérias lácticas foi realizada no queijo em processamento do ensaio 8. No queijo em processamento obtido para a produção dos ensaios 5 a 7 também foram determinadas as contagens de *L. paracasei*.

As determinações de pH, acidez livre, umidade, atividade de água, coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* spp. foram realizadas nos produtos finais após 1, 7 e 14 dias nos ensaios 5 e 6, e após 1 e 7 dias nos ensaios 7 e 8. A contagem de bactérias lácticas foi realizada no ensaio 8. Exceto para o ensaio 8, as determinações de *L. paracasei* também foram efetuadas.

3.1.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos

Decorridos os tempos de armazenamento descritos para cada um dos ensaios pilotos, porções de 25 g de queijo (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se o Bag Mixer 400 (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Posteriormente, nos queijos processados com a adição de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82) (ensaios pilotos 1, 2, 5 a 7), foi feita a contagem dessa bactéria probiótica. Para esse fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, fundido e resfriado a cerca de 45°C. Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) a 37°C por 72 horas.

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar MRS (Oxoid) e ágar Baird-Parker (base para ágar Baird-Parker, Oxoid, adicionado de telurito e gema de ovo— suplemento SR054C, Oxoid), para a contagem de bactérias lácticas (apenas para os ensaios pilotos 3, 4 e 8) e de *Staphylococcus* spp., respectivamente. 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 e de *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. A incubação das placas de ágar Baird-Parker e de Petrifilm™EC foi feita a 35°-37°C

por 48 e por 24 horas, respectivamente. A incubação das placas de ágar MRS foi feita a 30°C por 48 horas (COMPENDIUM..., 1992; STANDARD..., 1992).

3.1.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento

Durante a produção dos diversos tipos de queijo fresco cremoso, os parâmetros microbiológicos foram determinados no leite utilizado como principal matéria-prima, no produto em processamento - entre a etapa de dessoragem e a homogeneização do queijo com outros ingredientes em liquidificador e no produto final – queijo fresco cremoso. Conforme descrito no item **3.1.4**, foram efetuadas contagens de *Lactobacillus paracasei* (para os ensaios pilotos 1, 2, 5 a 7), de bactérias lácticas (para todas as amostras de leite, ensaios pilotos 3, 4 e 8), de coliformes e *E.coli* e de *Staphylococcus* spp.

3.1.6. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos particularmente para cada um dos ensaios pilotos, foram feitas as determinações de:

- pH, em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo DME-CF (Digimed, São Paulo, Brasil);
- acidez titulável em solução normal (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- umidade a 70°C, em estufa a vácuo (Marconi MA030112, Piracicaba, SP, Brasil), a partir de amostras com 5 g (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- atividade de água (aw) a 25°C em aparelho Novasina aw Center AWC 503-C (Novasina, Pfäfikon, Suíça)

A análise de acidez titulável foi feita em duplicata. As demais foram realizadas em triplicata.

3.2. Ensaios definitivos

3.2.1. Elaboração dos queijos

A figura 2 mostra, resumidamente, as principais etapas de fabricação dos ensaios definitivos realizados e apresentados neste trabalho.

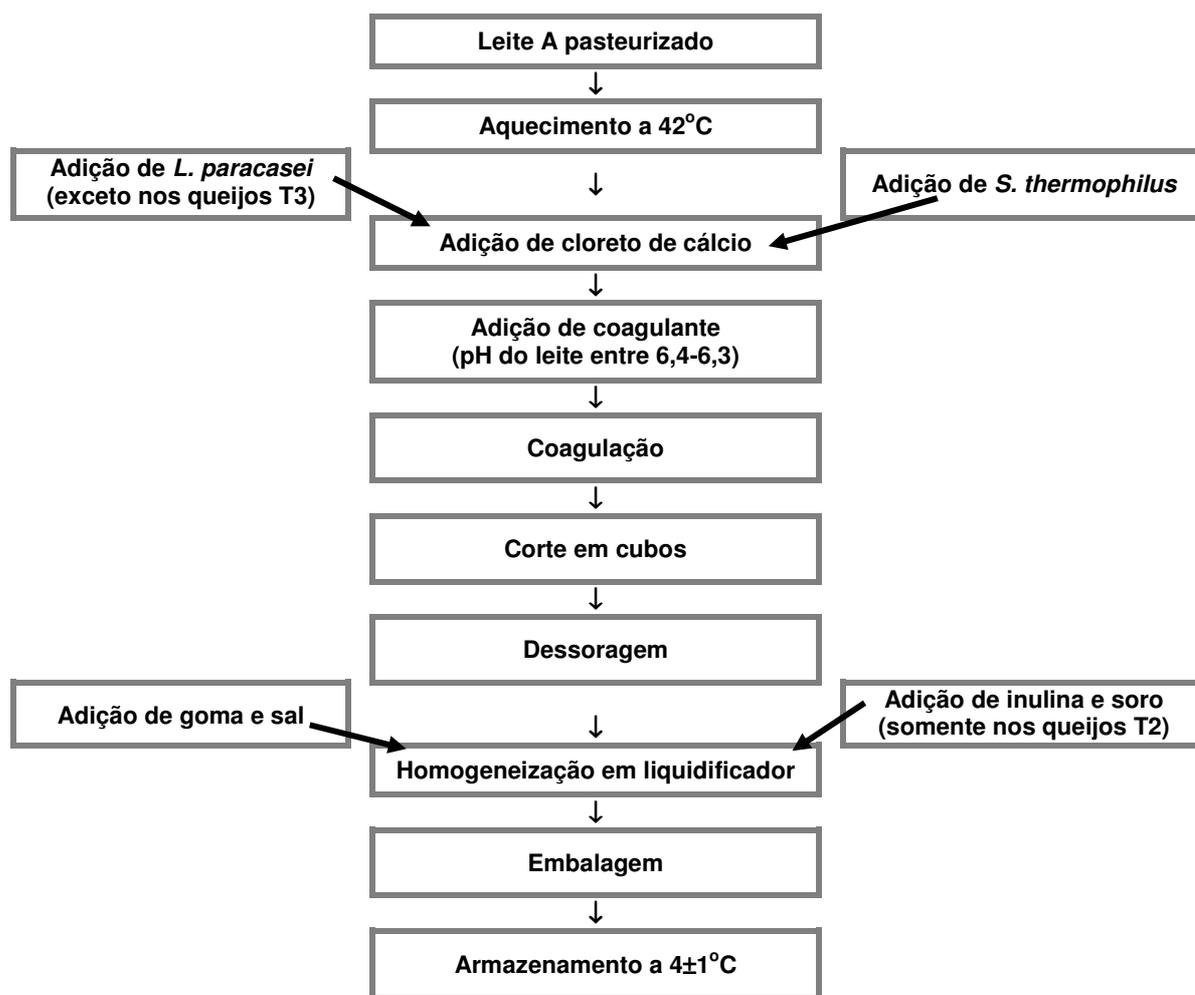


Figura 2: Fluxograma contendo as principais etapas de produção dos queijos dos ensaios definitivos elaborados neste trabalho.

A partir do comportamento microbiológico obtido durante o armazenamento dos queijos produzidos nos ensaios pilotos 5 a 8, verificou-se a necessidade de diminuir o pH desse produto para melhorar a sua conservação. Para tal fim, o emprego de acidificação direta nos queijos foi substituído pela adição da cultura láctica de *Streptococcus thermophilus* nos ensaios definitivos. A tecnologia de

produção dos queijos dos ensaios definitivos deste trabalho foi adaptada da formulação de queijo Quark obtido a partir de leite desnatado (0,25% de gordura) desenvolvido por CARDARELLI *et al.* (2003).

Três tecnologias de produção de queijo fresco cremoso foram testadas, de acordo com as variáveis apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Variáveis envolvidas na elaboração dos queijos produzidos nos ensaios definitivos.

Tratamentos	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Inulina Raftiline® HP-Gel
T1	+	+	-
T2	+	+	+
T3	+	-	-

+ = Adição. - = Sem adição.

Os queijos foram preparados, utilizando-se leite tipo A semi-desnatado, pasteurizado e homogeneizado comercial Xandô (Fazenda Colorado, Araras, Brasil, 10L para cada queijo). Os três tipos de queijo foram produzidos através de acidificação com cultura “starter” termofílica de *Streptococcus thermophilus* (TA 040, Danisco, Dangé, França). Após aquecimento do leite a 42-43°C, a cultura “starter” termofílica e a cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82, Danisco) foram adicionadas nos queijos T1 e T2. Aos queijos T3 foi adicionada somente a cultura termofílica. A cultura de *Streptococcus thermophilus*, assim como a cultura de *Lactobacillus paracasei*, é uma cultura liofilizada do tipo DVS e foi armazenada congelada. A adição das culturas ao leite foi feita na proporção de 30 mg/L (cultura “starter”) e de 10 mg/L (cultura probiótica). O cloreto de cálcio (0,25 g/L) foi adicionado juntamente às culturas. O coalho bovino em pó (Ha-la, Christian Hansen, 50 mg/L) foi adicionado quando o leite atingiu o pH 6,4-6,3. Após a coagulação, o queijo foi cortado e dessorado em saco esterilizado de pano alvejado em estufa a 15°C por 6 horas. Parte do soro obtido da fabricação dos queijos T2 foi acondicionada em frasco com tampa estéril e imediatamente refrigerada a 4±1°C. A massa de queijo resultante foi cortada e acondicionada em béqueres estéreis, coberta com filme de PVC e incubada em estufa a 13°C durante a noite, de modo a possibilitar uma acidificação dessa massa-base a valores de pH igual ou inferiores a 5. No dia

seguinte, os béqueres contendo a massa-base de queijo fresco foram armazenados sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, até a etapa de homogeneização em liquidificador. As proporções de ingredientes adicionados durante a homogeneização dos queijos T1, T2 e T3 estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Proporção de ingredientes utilizados nos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).

Ingredientes	Queijos		
	T1	T2	T3
Massa-base de queijo fresco	98,7%	74,7%	98,7%
Inulina	–	8%	–
Soro de queijo	–	16%	–
Sal	0,8%	0,8%	0,8%
Goma xantana	0,5%	0,5%	0,5%
Total	100%	100%	100%

– = Sem adição.

Nos três tipos foram adicionados 0,8% de sal e 0,5% de goma xantana Rhodigel 80 (Rhodia) calculados de acordo com o rendimento final obtido para cada queijo. No caso dos queijos T2, a inulina Raftiline® HP-Gel (Orafti), foi previamente dissolvida no soro de queijo aquecido a $55-60^{\circ}\text{C}$, na proporção 1:2 (uma parte de inulina para duas partes de soro), e imediatamente incorporada à massa de queijo para a homogeneização.

O produto final foi acondicionado em potes individuais, contendo 40 g de queijo cada², ocupando um volume médio de $2,0 \times 2,5 \times \pi \text{ cm}^3$ em cada pote, selados com tampa metálica, imediatamente resfriados e armazenados.

Foram realizados 5 ensaios de cada um dos tratamentos.

3.2.2. Armazenamento e períodos de amostragem

Os queijos foram armazenados sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$). As determinações dos parâmetros microbiológicos, de textura e dos demais parâmetros físico-químicos das amostras foram feitas no dia seguinte à fabricação (1 dia) e após 7, 14 e 21 dias. O tempo de vida de prateleira a que foram submetidos os queijos

² Na produção utilizada para a análise sensorial, foram acondicionados 30g de queijo nos potes.

produzidos neste trabalho foi baseado em estudos anteriores realizados com queijo Minas frescal pelo nosso grupo de pesquisa (BURITI *et al.*, 2005; BURITI *et al.*, *no prelo*; ROCHA *et al.*, 2003). As determinações de gordura, proteínas, cinzas e frutanos foram realizadas posteriormente a partir de amostras congeladas, sendo que para as análises dos teores de gordura, proteínas e cinzas foram utilizadas porções do produto final (1 dia) e para frutanos (queijo T2) foram utilizadas porções do produto final (1 dia) e do produto após 21 dias de armazenamento.

3.2.3. Determinação dos parâmetros microbiológicos

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item 3.2.2, porções de 25 g de queijo (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se o Bag Mixer 400 (Interscience). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Posteriormente, nos queijos processados com a adição de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82) (queijos T1 e T2), foi feita a contagem dessa bactéria probiótica. Para esse fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar MRS (Oxoid), acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial, fundido e resfriado a cerca de 45°C. Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) a 37°C por 72 horas.

Paralelamente, alíquotas de 1 ml de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis, imediatamente adicionadas de ágar M17 (Oxoid) com lactose (Oxoid), fundido e resfriado a cerca de 45°C, para a contagem de *Streptococcus thermophilus*. Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar MRS (Oxoid) e ágar Baird-Parker (base para ágar Baird-Parker, Oxoid, adicionado de telurito e gema de ovo– suplemento SR054C, Oxoid), para a contagem de bactérias lácticas (apenas para os queijos T3, sem a adição de *L. paracasei*) e de *Staphylococcus* spp., respectivamente. Alíquotas de 1 mL de

cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™EC (3M Microbiology), para a contagem de coliformes e de *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. A incubação das placas de ágar Baird-Parker e de Petrifilm™EC foi feita a 35°-37°C por 48 e por 24 horas, respectivamente. A incubação das placas de ágar MRS foi feita a 30°C por 48 horas (COMPENDIUM..., 1992; STANDARD..., 1992).

3.2.4. Determinações de parâmetros microbiológicos adicionais

Para as determinações microbiológicas adicionais, a homogeneização das amostras de queijo e as diluições decimais foram realizadas conforme descrito no item **3.2.3**. Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™YM (3M Microbiology), para contagem de bolores e leveduras e para placas Petrifilm™ Staph Express (3M Microbiology), para contagem de *Staphylococcus* DNase positivos, todas de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 1 mL das amostras de leite foram transferidas para placas Petrifilm™AC (3M Microbiology), para a contagem total de microrganismos aeróbios. A incubação das placas de Petrifilm™YM foi feita à temperatura ambiente (25°C) por 5 dias. A incubação das placas de Petrifilm™ Staph Express e de Petrifilm™AC foi feita a 35°-37°C por 24 e 48 horas, respectivamente.

3.2.5. Determinações de parâmetros microbiológicos durante o processamento

Durante a produção dos diversos tipos de queijo fresco cremoso, os parâmetros microbiológicos foram determinados no leite utilizado como principal matéria-prima, no produto em processamento - entre a etapa de dessoragem e a homogeneização do queijo com outros ingredientes em liquidificador e no produto final – queijo fresco cremoso. Conforme descrito nos itens **3.2.3** e **3.2.4**, foram efetuadas contagens de *Lactobacillus paracasei* (para os queijos T1 e T2), *Streptococcus thermophilus* (exceto no leite), de bactérias lácticas (para todas as amostras de leite e para T3), de coliformes e *E.coli*, de *Staphylococcus* spp., de *Staphylococcus* DNase positivos, de bolores e leveduras e de microrganismos aeróbios (somente no leite).

Exceto para a determinação de *Staphylococcus* DNase positivos e para a determinação de bactérias lácticas nos queijos T3, as contagens microbiológicas foram acompanhadas em quatro ensaios (repetições) dos queijos T1, T2 e T3. As contagens de *Staphylococcus* DNase positivos somente foram realizadas em dois ensaios dos queijos T1 e T3 e em um ensaio de T2. As contagens de bactérias lácticas foram realizadas nos cinco ensaios dos queijos T3.

3.2.6. Determinação da textura instrumental

O perfil de textura dos queijos T1, T2 e T3 foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras contidas nas embalagens plásticas (4 a 6 amostras de cada queijo em cada período de análise), com peso constante, utilizando cilindro de alumínio de 25 mm de diâmetro (P25), em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido). Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram analisados os atributos primários firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade e o atributo secundário gomosidade. Foram empregados os seguintes parâmetros: amostras de queijo fresco cremoso com altura e diâmetro de 2 cm e de 5 cm, respectivamente, temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, distância e velocidade de compressão de 10 mm e de 1 mm/s, respectivamente. O perfil de textura foi acompanhado nos cinco ensaios dos queijos T1, T2 e T3.

3.2.7. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item **3.2.2**, foram feitas as determinações de:

- pH, em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda.), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo DME-CF (Digimed);
- acidez titulável em solução normal (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- umidade a 70°C , em estufa a vácuo (Marconi MA030112), a partir de amostras com 5 g (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);

- atividade de água (aw) a 25°C em aparelho Novasina aw Center AWC 503-C (Novasina);
- gordura, através da extração de lipídios com éter etílico, em Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- proteínas, através análise do conteúdo de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38; adaptado de ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2003a,b);
- cinzas, determinada gravimetricamente pela incineração de 2g de amostra seca à 550°C até eliminação completa de carvão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- carboidratos totais (incluindo fibras), calculado pela diferença para se obter 100% da composição total.

A análise de acidez titulável foi feita em duplicata. As demais foram realizadas em triplicata.

As análises de umidade, pH, gordura, proteínas e cinzas foram efetuadas nos cinco ensaios dos tratamentos T1, T2 e T3, sendo que a umidade e o pH também foram determinados na massa-base de queijo fresco entre a etapa de dessoragem e a homogeneização com outros ingredientes. A acidez titulável e a aw foram medidas em quatro ensaios dos tratamentos T1, T2 e T3.

O método de determinação de gordura em lactobutirômetro de Gerber foi empregado para a determinação do teor de gordura dos leites utilizados em três ensaios do tratamento T1 e em dois ensaios dos tratamentos T2 e T3, de acordo com as normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.2.8. Determinação quantitativa de açúcares e de frutanos

A quantificação de açúcares (glicose, frutose, galactose e sacarose) e frutanos foi realizada em 4 ensaios dos queijos T2, através do método de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência, com detector de pulso amperométrico, adaptado do método 997.08 AOAC, conforme descrito por HOEBREGS (1997). Para este fim, foram utilizadas amostras dos queijos T2 previamente congelados ao 1º e ao 21º dias de armazenamento, em duplicata. A fibra Raftiline® HP-Gel foi analisada, em duplicata, paralelamente às amostras de queijo para verificar a eficiência do

método em comparação ao laudo do fabricante. Para hidrólise enzimática das amostras foi utilizada a enzima Fructozyme® L (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Soluções dos açúcares padrões sacarose (Sucrose 99+%, A.C.S., Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA, 0,81µg/25µL), glicose (α -D-Glucose, A.C.S., Aldrich, 0,67µg/25µL), frutose (D(-)-Fructose, 99+%, D-Fructose, 99+%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha, 0,45µg/25µL e 0,65µg/25µL) e galactose (D-Galactose, 97%, Aldrich, 0,52µg/25µL) também foram analisadas pelo mesmo método de cromatografia para a correção final dos resultados de carboidratos das amostras de queijo e Raftiline® HP-Gel. Neste trabalho foi utilizado um cromatógrafo Dionex® HPLC System, contendo injetor automático A550, bomba EGP40, detector de pulso amperométrico ED40 com eletrodo de trabalho de ouro e coluna PA1 com respectiva pré-coluna (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA). Foi utilizado gradiente, iniciando com 40% H₂O e 60% de NaOH 18 mM, atingindo 90% de NaOH 18 mM após 15 minutos e 100% de NaOH 18 mM após 25 minutos. O volume de injeção foi de 25 µL.

3.2.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema fatorial 3×4, constituído de 3 tipos de combinações em termos da presença ou não da cultura de *Lactobacillus paracasei* e de inulina adicionados durante a produção dos queijos e de 4 tempos (1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento), com 4 ou mais repetições (GOMES, 1987; BARROS NETO, 2003).

Exceto para os resultados da análise de frutanos, a análise estatística dos ensaios definitivos do presente trabalho foi realizada no Centro de Estatística Aplicada (CEA) do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME/USP), com a consultoria dos professores do Departamento de Estatística e de um aluno formando do bacharelado em Estatística. Os resultados de pH, acidez livre, umidade, *aw*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus*, firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade dos diferentes experimentos foram comparados através de análise de variância, empregando-se o modelo misto “split-plot” (NETER et al., 1996). Tal modelo foi escolhido devido à capacidade de ajustar a variabilidade da composição

centesimal dos queijos analisados neste trabalho, decorrente da variação do teor de gordura do leite utilizado para a sua fabricação (SOLER & YAMAGUCHI, 2004). A comparação dos resultados dos parâmetros microbiológicos indicadores de contaminação coliformes totais, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* DNase positivos e bolores e leveduras foram analisados através do teste binomial exato (CONOVER, 2001).

A comparação dos resultados de frutanos, lactose, sacarose, frutose, glicose e galactose dos queijos T2 ao 1º e ao 21º dias de armazenamento foi realizada através de análise de variância, com utilização do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (GOMES, 1987; CALLEGARI-JACQUES, 2003).

3.2.10. Análise sensorial

A análise sensorial deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme declaração constante no Anexo 1. A avaliação sensorial dos queijos foi realizada 7 dias após a sua fabricação, tendo em vista o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes bioquímicos do queijo que interferem no seu sabor (“maturação”). A análise foi conduzida segundo o delineamento de ordenação em blocos casualizados com 44 provadores não treinados, empregando-se teste de preferência, com notas que variaram de 1 (“amostra preferida”) a 3 (“amostra menos preferida”). Com a finalidade de se obter maiores informações sobre as características sensoriais de cada queijo, os provadores foram instruídos a relatar os atributos sensoriais que contribuíram para a escolha das amostras “preferida” e “menos preferida”. Os dados foram tratados via teste não paramétrico de Friedman, seguido de comparação múltipla e do coeficiente de concordância de Kendall (SHIROSE & MORI, 1994; LAWLESS & HEYMANN, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio pilotos

4.1.1. Ensaio 1 e 2

Os ensaios 1 e 2 foram realizados para a confirmação das proporções de ingredientes utilizados para produção do queijo cremoso. A tabela 6 mostra os resultados das análises realizadas nos leites empregados na produção dos queijos dos ensaios 1 e 2.

Tabela 6: pH e análises microbiológicas realizadas nos leites utilizados para os ensaios 1 e 2.

	leite (ensaio 1)	leite (ensaio 2)
pH	6,83	6,82
pH após a adição de ácido láctico	6,65	6,56
Coliformes totais (ufc/ml)	<1	1
<i>Escherichia coli</i> (ufc/ml)	<1	<1
<i>Staphylococcus</i> spp. (ufc/ml)	<10	<10
Bactérias lácticas (ufc/ml)	3×10^1	$2,57 \times 10^2$

Embora as características microbiológicas dos leites estivessem dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2002), tanto a massa base de queijo fresco, como os produtos finais apresentaram elevada contaminação (tabela 7).

Ambos os queijos foram elaborados de acordo com as boas práticas de fabricação, havendo amplo controle da higiene dos utensílios empregados e da manipulação das matérias-primas e do queijo durante todo o processamento.

O tempo de coagulação do leite pode ter representado uma etapa crítica para a multiplicação de microrganismos durante a produção dos queijos. A presença de células injuriadas de bactérias contaminantes, não destruídas pela pasteurização, podem não ter sido detectadas na análise do leite. No entanto, a temperatura (36°C) e pH (6,8 a 6,5) do leite podem ter oferecido condições de adaptação e multiplicação de tais microrganismos durante a etapa de coagulação.

Tabela 7: Análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nos queijos em processamento e nos produtos finais dos ensaios 1 e 2.

	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Queijo em processamento	Produto final 1 dia	Queijo em processamento	Produto final 1 dia
pH	6,48	6,47	6,4	6,31
Acidez livre (% v/p)*		0,08		0,12
Umidade (%)	71,12	66,78	70,72	69,5
Aw*		0,981		0,982
Coliformes totais (log ufc/g)	3,05	4,66	5,53	6,38
<i>Escherichia coli</i> (log ufc/g)	<1	<1	5,08	6,04
<i>Staphylococcus</i> spp. (log ufc/g)	2,78	5,59	4,39	5,05
<i>Lactobacillus paracasei</i> (log ufc/g)	6,28	7,17	6,93	7,76

*Análises não realizadas no queijo em processamento.

O intervalo de pH ótimo para a multiplicação de *Escherichia coli* está compreendido entre 6,0 e 8,0. Para a multiplicação de *Staphylococcus aureus*, o pH ótimo varia de 6,0 a 7,0 (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Os tempos entre o aquecimento do leite a 36-37°C para a coagulação e o corte, para posterior dessoragem e refrigeração do queijo em processamento, foram de 4 horas e 30 min e de 6 horas, respectivamente, para os ensaios 1 e 2.

Por outro lado, as contagens de *Lactobacillus paracasei* nos ensaios 1 e 2 encontraram-se superiores aos valores mínimos de 6 - 7 log ufc/g (tabela 7), correspondente à ingestão diária de 8 a 9 log ufc contidas uma porção de 100 g de alimento lácteo capaz de exercer atividade promotora da saúde como probiótico, citados por LEE & SALMINEN (1995) e HOIER et al. (1999).

Ambos os queijos em processamento apresentaram teores de umidade bastante próximos. O menor teor de umidade do queijo fresco cremoso do ensaio 1 em relação ao do ensaio 2 foi decorrente da presença de inulina, responsável pelo maior aumento do teor de sólidos nesse queijo. Os valores de aw foram bastante próximos para os dois queijos, aparentemente não houve interferências do teor de umidade e adição de inulina na aw (tabela 7). O menor valor de pH e a maior acidez livre do ensaio 2 estão provavelmente associados à maior contaminação por coliformes (tabela 7).

4.1.2. Ensaio 3 e 4

A tabela 8 mostra os valores de pH e das contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e bactérias lácticas obtidos para o leite e queijo em processamento dos ensaios 3 e 4.

Tabela 8: Análises realizadas no leite e queijo em processamento dos ensaios 3 e 4.

	leite	queijo em processamento	
		ensaio 3	ensaio 4
pH	6,95	6,67	6,67
Coliformes totais (log ufc/ ml ou g)	2,44	4,45	3,36
<i>Escherichia coli</i> (log ufc/ml ou g)	0*	2,70	2,78
<i>Staphylococcus</i> spp. (log ufc/ml ou g)	1,74	2,70	2,40
Bactérias lácticas (log ufc/ ml ou g)	1,60	6,56	6,59

*Presença de uma colônia em 1 ml de leite puro (diluição 0).

Após a análise do leite e queijo em processamento dos ensaios 3 e 4, foi decidido substituir o leite pelo de outro fornecedor para a condução deste trabalho, com o objetivo de melhorar a qualidade microbiológica do queijo produzido. A legislação brasileira exige que, até a saída do estabelecimento industrial produtor, o leite pasteurizado tipo A deve apresentar ausência de coliformes a 45°C, o que equivale à ausência de *E. coli* (BRASIL, 2002). Entretanto, para queijos com alto teor de umidade, como os queijos elaborados neste trabalho, são permitidas contagens de tais microrganismos de até 5×10^3 ufc/g (BRASIL, 1996). De qualquer forma, pretendia-se a fabricação de queijos em que a presença de *E. coli* não fosse detectada já no leite utilizado como matéria-prima. As contagens dos demais microrganismos presentes determinaram uma contaminação ainda maior do queijo produzido, mesmo com a redução do tempo em que o leite foi exposto à temperatura ótima para a multiplicação de microrganismos contaminantes (nos ensaios 3 e 4, o tempo entre o início da coagulação a 36°C e o término da dessoragem a 20°C foi de 2 horas e 50 minutos). As contagens de microrganismos contaminantes observadas no leite e queijo em processamento dos ensaios 3 e 4 reforçam as suspeitas de que a contaminação observada nos ensaios 1 e 2 foi decorrente do leite utilizado.

4.1.3. Ensaio 5 a 8

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas dos ensaios 5 a 8 são apresentados na tabela 9.

Na produção dos ensaios 5 a 8 buscou-se uma melhoria da qualidade microbiológica do leite, queijo em processamento e queijo fresco cremoso (produto final). Em nenhum desses 4 ensaios foi possível a aquisição de um leite em que a presença de microrganismos contaminantes não fosse detectada através de análise microbiológica (tabela 9). Aos 14 dias, os queijos produzidos nos ensaios 5 e 6 já apresentavam sinais de deterioração pela presença de coloração esverdeada, provavelmente provocada por *Pseudomonas*, embora não tenha sido realizada análise para confirmar tal contaminação. O aumento do pH dos queijos dos ensaios 5 e 6 após 14 dias pode ter sido decorrente de degradação protéica realizada por bactérias daquele gênero (tabela 9). Dessa forma, as análises dos queijos apresentadas na tabela 9, que deveriam ser efetuadas até os 21 dias após seu processamento, foram interrompidas aos 14 dias para os ensaios 5 e 6 e aos 7 dias para os ensaios 7 e 8, uma vez que os últimos foram produzidos após uma semana da fabricação dos primeiros. Novas modificações foram introduzidas posteriormente (ensaios definitivos) no processamento dos queijos, com o objetivo de evitar/reduzir a multiplicação de microrganismos contaminantes e/ou deteriorantes.

No entanto, pela adição de maior quantidade de coagulante e conseqüente diminuição do tempo de coagulação (aproximadamente 1 hora para os ensaios 5 a 8) foi possível que, nos quatro ensaios, tanto o queijo em processamento quanto o produto final apresentassem menor contaminação em relação aos queijos produzidos nos ensaios 1 e 2 (tabela 7). De qualquer modo, a substituição pelo leite de um novo fornecedor proporcionou maior segurança para a produção dos queijos, já que a presença de *E. coli* não foi detectada em nenhum momento no decorrer dos ensaios 5 a 8 (tabela 9).

A viabilidade de *Lactobacillus paracasei* mostrou-se aceitável no produto final (após 1 dia de fabricação) e durante os demais períodos de análise dos ensaios 5 a 7 (tabela 9), revelando contagens superiores ao mínimo de log 6 - 7 ufc/g proposto por LEE & SALMINEN (1995) e HOIER et al. (1999) para a promoção de efeitos benéficos ao hospedeiro pelos alimentos probióticos.

Tabela 9: Análises físico-químicas e microbiológicas realizadas no leite, queijo em processamento e produto final após 1, 7 e 14 dias* de armazenamento sob refrigeração a 4±1°C dos ensaios 5 a 8.

	pH	Acidez livre (% v/p)**	Umidade (%)	Aw**	Coliformes totais (log ufc/ml ou g)	<i>E. coli</i> (log ufc/ml ou g)	<i>Staphylococcus</i> spp. (log ufc/ml g)	Bactérias lácticas (log ufc/ml ou g)	<i>L. paracasei</i> (log ufc/g)
Leite	6,87				0***	<0***	1,00	2,00	
Queijo processamento	6,74		63,77		<1	<1	<2		6,36
Ensaio 5 Produto final - 1 dia	6,49	0,090	63,12	0,979	1,90	<1	3,08		7,05
7 dias	6,36	0,108	62,89	0,977	2,20	<1	3,00		7,16
14 dias	6,61	0,315	62,74	0,982	3,90	<1	3,89		7,52
Leite	6,89				1,08	<0	<1	<1	
Queijo processamento	6,69		63,12		1	<1	<2		6,38
Ensaio 6 Produto final - 1 dia	6,5	0,080	60,96	0,979	1,30	<1	<2		7,06
7 dias	6,41	0,094	60,83	0,981	<1	<1	2,30		7,15
14 dias	6,61	0,212	60,54	0,983	<1	<1	2,90		7,41
Leite	6,87				<0	<0	1,48	<1	
Queijo processamento	6,67		66,07		<1	<1	2,00		6,39
Ensaio 7 Produto final - 1 dia	6,62	0,090	63,55	0,978	<1	<1	2,48		7,00
7 dias	6,45	0,090	63,19	0,977	<1	<1	2,78		7,09
Leite	6,88				<0	<0	1,30	<1	
Queijo processamento	6,65		67,77		<1	<1	2,30	2,00	
Ensaio 8 Produto final - 1 dia	6,57	0,084	64,24	0,979	<1	<1	2,30	4,72	
7 dias	6,46	0,105	64,76	0,981	<1	<1	3,22	4,15	

* Análises nos ensaios 7 e 8 foram realizadas somente após 1 e 7 dias de armazenamento.

** Análises não realizadas no queijo em processamento.

*** <0 log ufc/ml: não foram detectadas colônias em 1 ml de leite puro (diluição 0). 0 log ufc/ml: presença de uma colônia em 1 ml de leite puro (diluição 0).

Nos quatro ensaios, os valores de pH do leite apresentaram-se bastante próximos. O pH do queijo em processamento e sua diminuição após 1 e 7 dias foi semelhante para os ensaios de 5 a 8. Entre 1 e 7 dias após a fabricação dos queijos cremosos, houve menor aumento da acidez titulável nos ensaios 6 e 7, produzidos com a adição de inulina. Houve aumento da acidez titulável durante os 14 dias de armazenamento dos ensaios 5 e 6, porém, esses queijos apresentaram elevação do pH entre o 7º e o 14º dia (tabela 9). Possivelmente nesses queijos, a presença de bactérias deteriorantes ocasionou, simultaneamente, uma produção de ácido (com um conseqüente aumento da acidez) e liberação de aminas decorrente de proteólise, que teria promovido o aumento do pH aos 14 dias.

Os queijos em processamento dos ensaios 5 e 6 apresentaram teor de umidade inferior em relação ao obtido para os ensaios 7 e 8. No ensaio 5, praticamente não houve diferença entre a umidade da massa-base de queijo e do produto final. Nos ensaios 6 a 8, houve grande alteração do teor de umidade do queijo em processamento para o produto final. A adição de inulina contribuiu para o aumento do teor de sólidos e redução da umidade dos queijos frescos cremosos dos ensaios 6 e 7. A umidade do produto final pouco foi alterada durante as semanas de análise dos ensaios 5 a 8. Para os quatro ensaios, houve pouca variação da aw durante os períodos de análise (tabela 9).

4.2. Ensaios definitivos

4.2.1. Parâmetros físico-químicos

A tabela 10 mostra a evolução dos parâmetros físico-químicos dos queijos probiótico-T1, simbiótico-T2 e controle-T3 durante o armazenamento.

Tabela 10: Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio-padrão)* obtidos para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Queijos	Dias	pH	Acidez titulável (%)	Umidade (%)	Aw
T1	0	$5,11 \pm 0,22^{Aa}$	—	$67,18 \pm 3,95^{Aa}$	—
	1	$5,05 \pm 0,21^{Ab}$	$0,91 \pm 0,16^{Aa}$	$66,39 \pm 4,18^{Ab}$	$0,979 \pm 0,003^{Aa}$
	7	$4,91 \pm 0,23^{Ac}$	$1,19 \pm 0,19^{Ab}$	$66,14 \pm 4,17^{Ab}$	$0,978 \pm 0,004^{Ab}$
	14	$4,81 \pm 0,15^{Ad}$	$1,27 \pm 0,19^{Ac}$	$66,27 \pm 4,23^{Ab}$	$0,977 \pm 0,004^{Ab}$
	21	$4,80 \pm 0,15^{Ad}$	$1,32 \pm 0,19^{Ad}$	$66,03 \pm 4,30^{Ab}$	$0,977 \pm 0,003^{Ab}$
T2	0	$5,00 \pm 0,13^{Ba}$	—	$67,13 \pm 4,40^{Aa}$	—
	1	$4,85 \pm 0,08^{Bb}$	$0,81 \pm 0,09^{Aa}$	$65,38 \pm 3,30^{Ab}$	$0,980 \pm 0,004^{Aa}$
	7	$4,75 \pm 0,07^{Bc}$	$1,07 \pm 0,09^{Ab}$	$65,91 \pm 3,47^{Ab}$	$0,978 \pm 0,002^{Ab}$
	14	$4,63 \pm 0,06^{Bd}$	$1,12 \pm 0,08^{Ac}$	$65,05 \pm 3,18^{Ab}$	$0,978 \pm 0,002^{Ab}$
	21	$4,69 \pm 0,05^{Bd}$	$1,16 \pm 0,07^{Ad}$	$65,05 \pm 3,37^{Ab}$	$0,976 \pm 0,003^{Ab}$
T3	0	$5,15 \pm 0,24^{Aa}$	—	$68,55 \pm 3,04^{Aa}$	—
	1	$5,01 \pm 0,28^{Ab}$	$0,89 \pm 0,21^{Aa}$	$66,95 \pm 3,20^{Ab}$	$0,981 \pm 0,006^{Aa}$
	7	$4,90 \pm 0,25^{Ac}$	$1,17 \pm 0,26^{Ab}$	$67,41 \pm 2,87^{Ab}$	$0,977 \pm 0,002^{Ab}$
	14	$4,80 \pm 0,23^{Ad}$	$1,23 \pm 0,25^{Ac}$	$66,74 \pm 2,75^{Ab}$	$0,978 \pm 0,002^{Ab}$
	21	$4,83 \pm 0,18^{Ad}$	$1,27 \pm 0,27^{Ad}$	$66,46 \pm 2,69^{Ab}$	$0,978 \pm 0,002^{Ab}$

* Médias de 5 ensaios (repetições) de cada queijo para pH e umidade e de 4 ensaios para acidez titulável e aw.

— = não determinado.

^{A,B} sobrescritas na mesma coluna indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

^{a,b,c} sobrescritas na mesma coluna, para cada tratamento, indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento.

Os queijos T1, T2 e T3 apresentaram diminuição do pH e aumento da acidez titulável entre o 1^o e o 21^o dia de armazenamento. Para os três tipos de queijo, a redução do pH foi significativa entre a produção e o dia seguinte à fabricação, e após 7 e 14 dias de armazenamento ($p < 0,05$). A acidez titulável aumentou significativamente a cada semana de análise dos queijos T1, T2 e T3 ($p < 0,05$). O teor de umidade dos três tipos de queijo reduziu significativamente entre a

produção e o dia seguinte à fabricação ($p < 0,05$), mantendo-se constante, sem variação significativa ao longo dos 21 dias de armazenamento ($p > 0,05$). Os valores de aw dos queijos T1, T2 e T3 diminuíram significativamente entre o 1º e o 7º dia ($p < 0,05$), permanecendo sempre acima de 0,97 durante todo o armazenamento, fato que não representou um obstáculo para a multiplicação de microrganismos nos queijos.

A redução do pH e aumento da acidez titulável ocorrida nesses queijos é um processo natural decorrente da produção contínua de ácido láctico e outros ácidos orgânicos pela cultura “starter” de *Streptococcus thermophilus* em T1, T2 e T3 e pela cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei* em T1 e T2. Em estudo com queijos Minas frescal probióticos produzidos com *Lactobacillus paracasei* LBC-82 com ou sem a adição de cultura “starter” mesofílica composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* foi verificada uma maior acidificação ao longo de 21 dias de armazenamento nos queijos probióticos contendo a cultura “starter” em comparação aos queijos adicionados somente da bactéria probiótica, que apresentaram pH elevado e pequeno aumento da acidez titulável durante o armazenamento (BURITI *et al.*, 2005). No presente trabalho, a maior produção de ácido nos queijos T1, T2 e T3 foi provavelmente realizada pela bactéria *Streptococcus thermophilus* e, em menor grau, por *Lactobacillus paracasei*.

Os queijos T2 apresentaram valores de pH significativamente menores ($p < 0,05$) em comparação aos obtidos por T1 e T3 (tabela 10). As massas-base de queijo fresco utilizadas para a produção dos queijos T2 apresentaram pH médio ligeiramente mais baixo mesmo antes da homogeneização com os demais ingredientes, o que possivelmente contribuiu para o menor pH deste queijo durante todo o armazenamento. É importante ressaltar que as massas-base de queijo fresco utilizadas nos tratamentos T1 e T2 foram produzidas igualmente, sem nenhuma variação no processamento. Os queijos T1, T2 e T3 não diferiram significativamente quanto à acidez titulável, umidade e aw durante o armazenamento ($p > 0,05$).

De modo semelhante ao observado no presente trabalho com queijo fresco cremoso, MENDOZA *et al.* (2001) não verificaram alterações no pH e aw de lingüiças secas fermentadas adicionadas de inulina Raftiline® ST (pertencente à

mesma família da inulina Raftiline® HP-Gel utilizada neste trabalho, porém com menor grau de polimerização).

O teor médio de gordura, proteínas, cinzas e carboidratos totais por diferença (incluindo fibras) dos queijos T1, T2 e T3 após 1 dia de fabricação é apresentado na tabela 11.

Tabela 11: Teor de gordura, proteína, cinzas e carboidratos totais¹ (média ± desvio-padrão)² obtidos para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) no produto final – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT) – após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a 4±1°C.

	Queijos			variação de T2 ³ (%)
	T1	T2	T3	
Gordura ES (%)	28,70 ± 16,13	21,28 ± 11,60	27,66 ± 9,59	24,49
Gordura MT (%)	10,10 ± 6,53	7,70 ± 4,63	10,69 ± 3,94	25,93
Proteína ES (%)	49,67 ± 9,65	34,54 ± 3,54	50,37 ± 7,59	30,95
Proteína MT (%)	16,42 ± 2,26	11,86 ± 0,71	16,48 ± 2,05	27,90
Cinzas ES (%)	6,82 ± 1,51	5,39 ± 0,84	6,76 ± 1,36	20,62
Cinzas MT (%)	2,25 ± 0,33	1,84 ± 0,13	2,21 ± 0,37	17,49
Carboidratos totais ¹ ES (%)	14,91 ± 6,03	38,79 ± 7,35	15,20 ± 1,70	157,66
Carboidratos totais ¹ MT (%)	4,81 ± 1,61	13,23 ± 1,58	4,98 ± 0,33	170,28

¹ Calculado por diferença - inclui fibras

² Médias de 5 ensaios.

³ Porcentagem de variação dos queijos T2 em função dos valores médios de T1 e T3, segundo a equação: variação de T2 (%) = $100 - \frac{T2}{[(T1 + T3)/2]} \times 100$, em módulo.

Devido ao emprego da fibra inulina, os queijos T2 apresentaram uma redução média na matéria úmida de 25,9% do teor de gordura, 27,9% do teor de proteína e 17,5% do teor de cinzas em relação aos valores médios dos mesmos parâmetros obtidos para T1 e T3. A adição de inulina resultou em um aumento de 170,3% de carboidratos totais (incluindo fibras) nos queijos T2, em relação às médias obtidas para os queijos T1 e T3.

Houve grande variação no teor de gordura entre cada um dos cinco ensaios dos queijos T1, T2 e T3, resultando em um desvio-padrão elevado desse parâmetro para todos os tratamentos (tabela 11). Devido a esse fato, a partir da terceira repetição de T1 (T1.3, T1.4 e T1.5) e da quarta repetição de T2 (T2.4 e T2.5) e T3 (T3.4 e T3.5), o teor de gordura das amostras de leite também foi monitorado (figura 3). O teor de gordura dos leites utilizados para a fabricação dos

queijos T1.3, T1.4 e T1.5 foi de 0,8%, 0,5% e 2,35%, respectivamente. Nos leites empregados em T2.4, T2.5, T3.4 e T3.5, o teor de gordura foi de 1,0%, 2,3%, 0,7% e 2,3%, respectivamente. Foi possível confirmar que a oscilação do teor de gordura daqueles leites resultou em grande variação do teor de gordura dos respectivos queijos (figura 3). As diferenças observadas entre o teor de gordura das amostras de leite possivelmente implicaram em variações das porcentagens dos demais componentes ali presentes (carboidratos, proteínas e cinzas). Dessa forma, não houve homogeneidade do leite utilizado como principal matéria-prima para a elaboração dos queijos deste trabalho. É necessário destacar que os leites adquiridos para a produção dos queijos deste trabalho sempre pertenceram à mesma marca comercial do mesmo fabricante, que indicava na informação nutricional da embalagem o teor médio de gordura de 1,5%. No entanto, a legislação brasileira permite que o teor de gordura do leite pasteurizado tipo A semi-desnatado varie de 0,6% a 2,9% (BRASIL, 2002).

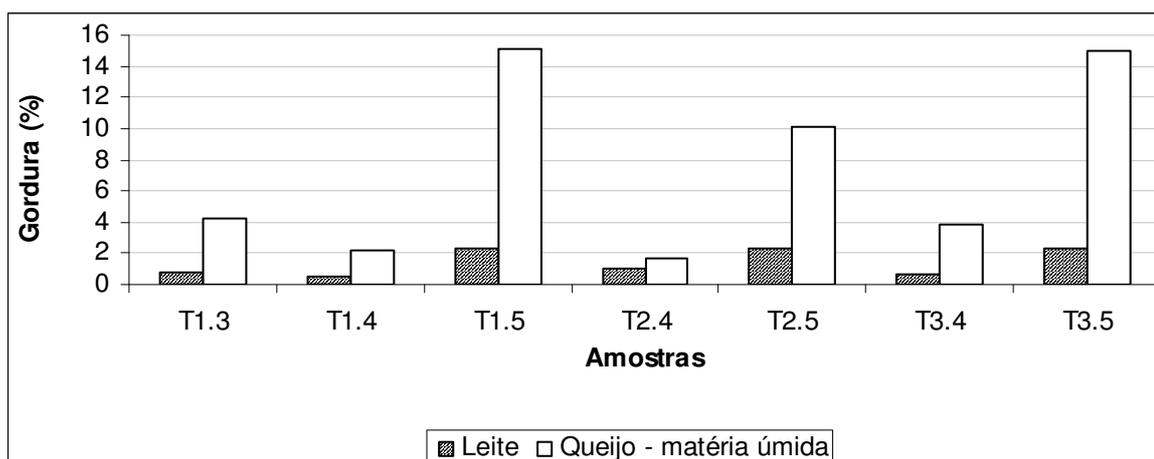


Figura 3: Teor de gordura do leite e respectivos produtos finais, queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle), após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. T1.3, T1.4 e T1.5 = três ensaios do queijo T1; T2.4 e T2.5 = dois ensaios do queijo T2; T3.4 e T3.5 = dois ensaios do queijo T3.

4.2.2. Parâmetros microbiológicos – microrganismos “starter” e probiótico

A tabela 12 mostra a evolução das contagens médias de *Streptococcus thermophilus* durante a produção e o armazenamento dos queijos T1, T2 e T3.

Tabela 12: Contagens de *Streptococcus thermophilus* (média \pm desvio-padrão)¹ obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Dias	Contagens de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log ufc/g)		
	T1	Queijos T2	T3
0	9,34 \pm 0,70 ^{Aac}	9,77 \pm 0,14 ^{Aac}	9,54 \pm 0,50 ^{Aac}
1	9,86 \pm 0,23 ^{Ab}	9,77 \pm 0,32 ^{Ab}	9,92 \pm 0,16 ^{Ab}
7	9,71 \pm 0,29 ^{Abc}	9,86 \pm 0,09 ^{Abc}	9,67 \pm 0,29 ^{Abc}
14	9,72 \pm 0,23 ^{Abc}	9,84 \pm 0,10 ^{Abc}	9,72 \pm 0,31 ^{Abc}
21	9,59 \pm 0,33 ^{Ac}	9,72 \pm 0,22 ^{Ac}	9,67 \pm 0,39 ^{Ac}

¹ Médias de 4 ensaios.

A,B sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

a,b,c sobrescritas na mesma coluna, para cada tratamento, indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento.

Não houve diferenças significativas entre os queijos T1, T2 e T3 quanto às contagens de *Streptococcus thermophilus* ($p > 0,05$), uma vez que os valores médios permaneceram similares para os três tratamentos durante o armazenamento, acima de 9,5 log ufc/g. A análise estatística apontou, para os três tipos de queijo, aumento significativo das contagens de *Streptococcus thermophilus* entre a produção e o 1º dia de armazenamento ($p < 0,05$) e uma diminuição significativa entre o 1º e o 21º dia ($p < 0,05$). No entanto, tal variação é irrelevante em termos microbiológicos (não superior a 0,5 log para os três queijos). VINDEROLA *et al.* (2000) estudaram o emprego de microrganismos probióticos em queijo fresco Argentino e observaram que as contagens da bactéria “starter” *Streptococcus thermophilus* variaram entre 8,46 a 9,33 log ufc/g, valores bastante próximos ao observado no presente estudo.

As contagens de *Lactobacillus paracasei* durante o armazenamento dos queijos T1 e T2 são apresentadas na tabela 13.

Houve um aumento significativo das contagens de *Lactobacillus paracasei*, cerca de 0,5 ciclo log, entre a produção e o 1º dia de armazenamento dos queijos T1 e T2 ($p < 0,05$). Durante todo o armazenamento, as contagens do microrganismo probiótico nos queijos T1 e T2 mantiveram-se sempre acima de 7 log ufc/g e o perfil da viabilidade dessa bactéria nesse período foi semelhante para ambos os queijos, apresentando um discreto, porém significativo, aumento

das contagens entre 1 e 21 dias após a fabricação ($p < 0,05$). No entanto, tal variação apresenta-se irrelevante em termos microbiológicos (apenas 0,2 ciclo log).

Tabela 13: Contagens de *Lactobacillus paracasei* (média \pm desvio-padrão)¹ obtidas para os queijos T1 (probiótico) e T2 (simbiótico) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Contagens de <i>Lactobacillus paracasei</i> (log ufc/g)		
Dias	Queijos	
	T1	T2
0	6,62 \pm 0,38 ^{Aa}	6,83 \pm 0,08 ^{Aa}
1	7,20 \pm 0,17 ^{Ab}	7,12 \pm 0,05 ^{Ab}
7	7,19 \pm 0,10 ^{Abc}	7,25 \pm 0,17 ^{Abc}
14	7,26 \pm 0,14 ^{Abc}	7,32 \pm 0,21 ^{Abc}
21	7,31 \pm 0,23 ^{Ac}	7,39 \pm 0,24 ^{Ac}

¹ Médias de 4 ensaios.

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

^{a,b,c} sobrescritas na mesma coluna, para cada tratamento, indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento.

A produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas em concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira é um desafio tecnológico (KOURKOUTAS *et al.*, 2005). Vários trabalhos propõem que a dose mínima diária de culturas probióticas 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 (HOIER *et al.*, 1999; LEE & SALMINEN, 1995; BLANCHETTE, 1996). Desse modo, as contagens da cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* nos queijos probióticos T1 e T2 estiveram suficientes para resultar em um produto com potencial probiótico durante todo o período de armazenamento e atenderiam aos requisitos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para esse tipo de produto (ANVISA, 2001).

Em 2001, a Diretoria de Alimentos e Toxicologia da ANVISA havia aprovado a recomendação da Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, propondo a viabilidade mínima de probióticos de 10^6 ufc/g durante o prazo de validade do produto, no caso leites fermentados à

base de *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Bifidobacterium lactis* (ANVISA, 2001). No presente momento, a Comissão para os alimentos com alegação de propriedades funcionais no Brasil não informou as quantidades mínimas de microrganismos viáveis que devem estar presentes em alimentos probióticos (ANVISA, 2005).

A adição de cepas do grupo *Lactobacillus casei* / *paracasei* na produção de queijos tem sido estudada e a viabilidade dessas espécies tem sido comparada com a de outras bactérias probióticas. VINDEROLA *et al.* (2000) elaboraram queijo fresco argentino adicionado de cepas de *Lactobacillus casei* combinadas ou somente com bifidobactérias ou com bifidobactérias e *Lactobacillus acidophilus*. Naquele estudo, as combinações de *Lactobacillus casei* e bifidobactérias resultaram em uma sobrevivência satisfatória desses microrganismos no queijo, superiores a 6 log ufc/g durante 60 dias de armazenamento, enquanto que a adição de *Lactobacillus casei* juntamente com *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias resultou em um queijo com elevadas contagens desses três microrganismos, superiores a 7 log ufc/g durante o mesmo período. Em estudo realizado por GARDINER *et al.* (1998), foi confrontado o desempenho de *Lactobacillus paracasei* com o de *Lactobacillus salivarius*, isolados de intestino delgado humano, durante a maturação de queijo Cheddar, no qual a espécie *Lactobacillus paracasei* apresentou multiplicação e manutenção de alta viabilidade (8 log ufc/g), enquanto que as contagens de *Lactobacillus salivarius* diminuíram.

O emprego de diferentes culturas em alimentos lácteos fermentados pode ocasionar interação das espécies adicionadas, que podem ser benéficas (protocooperação) ou indesejáveis (antagonismo) e resultarem em alterações da microbiota durante a fabricação e o armazenamento refrigerado desses produtos (BELLENGIER *et al.*, 1997). VINDEROLA *et al.* (2002) verificaram que 8 cepas probióticas de *Lactobacillus casei* foram capazes de inibir a multiplicação de cepas de *Streptococcus thermophilus* em ensaio de difusão em ágar, porém o efeito inibitório dessas últimas cepas sobre a espécie probiótica não foi observado. Os resultados obtidos no presente estudo não evidenciaram interações entre as espécies *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus thermophilus* que resultassem em favorecimento ou prejuízo da multiplicação desses microrganismos, pois o perfil de multiplicação da bactéria “starter” foi

semelhante tanto para T1 e T2, com a adição do probiótico, como para T3, sem a adição de *Lactobacillus paracasei*.

4.2.3. Parâmetros microbiológicos – microrganismos indicadores de contaminação e bactérias lácticas

A tabela 14 mostra as contagens microbiológicas obtidas nos leites utilizados para a elaboração dos queijos T1, T2 e T3.

Tabela 14: Parâmetros microbiológicos^a dos leites utilizados para a elaboração dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).

Parâmetros microbiológicos	Queijos					
	T1		T2		T3	
	Média	Varição ^b	Média	Varição ^b	Média	Varição ^b
Coliformes totais (ufc/ml)	<1	–	$1,25 \times 10^{-1}$	<1 - 1,00	$1,25 \times 10^{-1}$	<1 - 1,00
<i>Escherichia coli</i> (ufc/ml)	<1	–	<1	–	<1	–
<i>Staphylococcus</i> spp. (ufc/ml)	$2,49 \times 10^2$	<10 - 10^3	$2,5 \times 10^0$	<10 - 2×10^0	$2,83 \times 10^2$	<10 - $1,29 \times 10^3$
<i>Staphylococcus</i> DNase+ (ufc/ml)	<1	–	<1	–	<1	–
Bolores e leveduras (ufc/ml)	$2,5 \times 10^{-1}$	<1 - 1,00	5×10^{-1}	<1 - 3×10^0	$3,75 \times 10^{-1}$	<1 - $1,0 \times 10^0$
Bactérias lácticas (ufc/ml)	$2,69 \times 10^2$	<10 - $1,34 \times 10^3$	$2,28 \times 10^2$	<10 - $9,8 \times 10^2$	$3,4 \times 10^1$	<10 - $1,7 \times 10^2$
Aeróbios totais (log ufc/ml)	1,68	0,48 - 2,26	1,97	1,66 - 2,38	1,78	0,95 - 2,37

^a Médias de 4 ensaios, exceto *Staphylococcus* DNase positivos (DNase+) com dois ensaios de T1 e T3 e um ensaio de T2 e bactérias lácticas em 5 ensaios de T3.

^b Valores mínimos - máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.
– = sem variação.

A legislação brasileira exige que, até a saída do estabelecimento industrial produtor, o leite pasteurizado tipo A deve apresentar contagem padrão em placas de, no máximo, 1×10^3 ufc/g, número mais provável por ml (nmp/ml) de coliformes a 30-35°C menor que 1, ausência de coliformes a 45°C em 1 ml (equivalente à ausência de *Escherichia coli*) e ausência de *Salmonella* spp. em 25 ml (BRASIL, 2002).

A presença de coliformes no leite foi detectada somente em uma das produções dos queijos T2 e T3 (tabela 14). *Escherichia coli* não foi detectada em nenhuma das amostragens dos leites utilizados para o preparo de 4 ensaios dos

queijos T1, T2 e T3 (tabela 14). Em todas as amostras de leite analisadas foram detectados microrganismos aeróbios, com valores médios entre 1,5 log e 2 log ufc/ml (tabela 14). A presença de bolores e leveduras, de bactérias lácticas e de *Staphylococcus* spp. foi observada nas amostras dos leites utilizados para as produções dos queijos T1, T2 e T3 (tabela 14).

As espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* são produtoras da enzima nuclease termoestável ou desoxirribonuclease (DNAse) e compreendem a maioria dos microrganismos conhecidos como estafilococos coagulase-positivos (JAY, 2000; MARTIN & MYERS, 1994). Os testes de desoxirribonuclease, como o Petrifilm™ Staph Express, são uma alternativa para a enumeração de *Staphylococcus* produtores de coagulase e estão baseados na correlação com a metodologia clássica de determinação desses microrganismos (NODA *et al.* 2003; JAY, 2000). Nos leites utilizados para a fabricação de dois ensaios dos queijos T1 e T3 e de um ensaio de T2 não foram detectados *Staphylococcus* DNAse positivos (tabela 14).

Os parâmetros microbiológicos indicadores de contaminação coliformes totais, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* DNAse positivos (DNAse+) e bolores e leveduras analisados durante a produção e o armazenamento dos queijos T1, T2 e T3 são apresentados, respectivamente, nas tabelas 15, 16, 17 e 18. As contagens de bactérias lácticas durante a produção e o armazenamento dos queijos T3 são apresentadas na tabela 19.

Tabela 15: Contagens de coliformes totais (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Dias	Contagens de coliformes totais (log ufc/g)					
	T1 ^A		Queijos T2 ^A		T3 ^B	
	Média	Varição*	Média	Varição*	Média	Varição*
0	0,526	<1 - 1,60	0,375	<1 - 1,00	0,657	<1 - 1,48
1	<1	–	0,450	<1 - 1,30	0,623	<1 - 1,90
7	<1	–	0,125	<1 - 1,00	0,347	<1 - 1,48
14	<1	–	<1	–	<1	–
21	<1	–	<1	–	<1	–

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

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

– = sem variação.

Para queijos de muito alta umidade (maior que 55%) com bactérias lácticas viáveis e abundantes, como é o caso do queijo fresco cremoso elaborado neste trabalho, os limites máximos permitidos pela legislação são de 10^3 ufc/g de coliformes a 30°C , 10^2 ufc/g de coliformes a 45°C , 10^2 ufc/g de estafilococos coagulase positivos, 5×10^3 de bolores e leveduras e ausência em 25 g de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 1996).

A presença de coliformes totais foi observada nos queijos T1 somente no dia da produção (dia 0), enquanto que nos queijos T2 e T3 esses microrganismos foram observados durante a produção e após 1 e 7 dias de armazenamento (tabela 15). Não foram observadas contagens de coliformes durante o armazenamento dos queijos T1 e houve redução desses microrganismos entre o 1º e o 7º dia de armazenamento nos queijos T2 e T3, não sendo mais detectados até o 21º dia (tabela 15). Possivelmente, a multiplicação de coliformes nos queijos foi inibida pelo baixo pH. A ação inibitória do pH sobre o desenvolvimento de coliformes em queijo Minas frescal probiótico foi observada por ASSIS *et al.* (2002) e ROCHA *et al.* (2002). *Escherichia coli* não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas durante a produção e o armazenamento de 4 ensaios dos queijos T1, T2 e T3.

Tabela 16: Contagens de *Staphylococcus* spp. (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

<i>Staphylococcus</i> spp. (log ufc/g)						
Dias	T1 ^A		Queijos T2 ^A		T3 ^B	
	Média	Varição*	Média	Varição*	Média	Varição*
0	2,23	<2 - 3,72	1,12	<2 - 1,30	1,96	<2 - 3,85
1	2,19	<2 - 3,98	1,34	<2 - 2,48	3,29	2,30 - 4,02
7	1,48	<2 - 3,93	1,81	<2 - 3,52	3,11	2,00 - 3,98
14	2,03	<2 - 4,02	1,42	<2 - 3,54	3,00	<2 - 4,06
21	1,21	<2 - 3,85	1,71	<2 - 3,20	2,54	<2 - 4,03

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

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

Staphylococcus spp. foram detectados nos queijos T1, T2 e T3, com contagens médias ao longo do armazenamento entre 1,2 e 2,2 log ufc/g para os queijos T1, entre 1,0 e 2,0 log ufc/g para os queijos T2 e entre 2,5 e 3,3 log ufc/g para os queijos T3. As contagens médias de *Staphylococcus* spp. para os queijos T1 e T2 foram aproximadamente 1,0 ciclo log inferiores às contagens observadas para os queijos T3 durante todo o armazenamento (tabela 16).

Tabela 17: Contagens de *Staphylococcus* DNase positivos¹ obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 4±1°C.

Dias	<i>Staphylococcus</i> DNase positivos (log ufc/g)					
	T1 ^A		Queijos T2 ^A		T3 ^B	
	Média	Varição ²	Média	Varição ²	Média	Varição ²
0	<1	–	<1	–	<1	–
1	<1	–	<1	–	1,09	<1 - 2,26
7	<1	–	<1	–	0,89	<1 - 1,78
14	<1	–	<1	–	0,62	<1 - 1,48
21	<1	–	<1	–	<1	–

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

¹ Médias de dois ensaios de T1 e T3 e de um dos ensaios de T2.

² Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

– = sem variação.

A presença de *Staphylococcus* DNase positivos foi verificada em um ensaio de T3 após 1, 7 e 14 de fabricação, havendo diminuição das contagens médias nesse período, cerca de 0,8 ciclo log (tabela 17). Em uma das amostras coletadas no 1º dia de armazenamento de T3, a população de *Staphylococcus* DNase positivos esteve acima do limite exigido pela legislação (BRASIL, 1996).

Foram detectados bolores e leveduras aos 14 e 21 dias de armazenamento dos queijos T1, durante a produção e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento dos queijos T2 e após 1, 14 e 21 dias de armazenamento dos queijos T3 (tabela 18). Nos três tratamentos, as maiores contagens desses microrganismos foram verificadas aos 21 dias após a fabricação (tabela 18).

Tabela 18: Contagens de bolores e leveduras (médias de 4 ensaios) obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Dias	Bolores e leveduras (log ufc/g)					
	T1 ^A		Queijos T2 ^A		T3 ^A	
	Média	Variação*	Média	Variação*	Média	Variação*
0	<1	–	0,25	<1 - 1,00	<1	–
1	<1	–	<1	–	0,25	<1 - 1,00
7	<1	–	0,13	<1 - 1,00	<1	–
14	0,13	<1 - 1,00	0,13	<1 - 1,00	0,20	<1 - 1,60
21	0,46	<1 - 2,64	0,69	<1 - 1,90	1,03	<1 - 3,66

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

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

– = sem variação.

As contagens médias de bactérias lácticas iniciaram-se em 1,77 log ufc/g no 1º dia de fabricação para os queijos T3, aumentando em 1 ciclo log após 7 dias de armazenamento e aproximadamente 2 ciclos log após 21 dias (tabela 19).

Tabela 19: Contagens de bactérias lácticas (médias de 5 ensaios) obtidas para os queijos T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Dias	Bactérias lácticas (log ufc/g)	
	Queijo T3	
	Média	Variação*
0	1,65	<2 - 3,54
1	1,77	<2 - 4,15
7	2,81	2,00 - 3,77
14	2,91	<2 - 4,75
21	3,54	2,30 - 5,25

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

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho para coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* DNase positivos, foi cogitada a possibilidade de *Lactobacillus paracasei* inibir a proliferação dos microrganismos

contaminantes, uma vez que os valores máximos das contagens encontrados para tais variáveis indicadoras de contaminação foram inferiores para os queijos T1 e T2, quando comparadas àquelas obtidas para T3 (tabelas 15 a 17). Para a análise estatística, considerou-se o fato de as contagens observadas para os microrganismos contaminantes estarem ou não abaixo do limite de sensibilidade do método utilizado para a determinação daqueles microrganismos. Medições abaixo do limite de sensibilidade são boas, pois indicam baixa contaminação do queijo (<1 log ufc/g para coliformes totais e *Staphylococcus* DNase positivos, <2 log ufc/g para *Staphylococcus* spp.). Para efeito de comparação, no teste estatístico foi utilizado um valor de proporção menor ou igual à proporção de contagens superiores ao limite de sensibilidade dos testes microbiológicos realizados nos queijos adicionados da bactéria probiótica (SOLER & YAMAGUCHI, 2004).

O teste binomial exato realizado indicou que, para os queijos T3, as variáveis coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* DNase positivos apresentaram proporções elevadas de contagens acima do limite de sensibilidade dos mecanismos de medição, diferindo significativamente dos queijos T1 e T2 ($p < 0,05$), indicando que realmente o probiótico atuou como inibidor de contaminação (tabelas 15 a 17, Anexo 2). Não foram encontradas diferenças significativas entre os queijos T1, T2 e T3 em relação à contagem de bolores e leveduras (tabela 18, Anexo 2). ARICI *et al.* (2004) estudaram a atividade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de fezes de crianças, entre recém-nascidos e até dois anos de idade, sobre bactérias contaminantes de alimentos ou patógenos e verificaram que 4 cepas de *Lactobacillus paracasei* (IF8, IF9, IF10 e IF11) exerceram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 28213 e 3 cepas (IF8, IF10 e IF11) inibiram a multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 2392, em ensaios de difusão em ágar.

As condições microbiológicas do leite exercem um papel fundamental sobre o estabelecimento da microbiota do queijo. As contagens obtidas de coliformes totais e de *Staphylococcus* spp. para os queijos T1, T2 e T3 e de bactérias lácticas para os queijos T3 durante a produção e armazenamento dos queijos foram decorrentes das contagens iniciais desses microrganismos no leite. No entanto, as contagens de coliformes totais foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela legislação (BRASIL, 1996) em todos os ensaios dos queijos T1, T2 e T3.

Todos os queijos produzidos para o presente trabalho foram elaborados de acordo com as boas práticas de fabricação, havendo amplo controle da higiene dos utensílios empregados e da manipulação das matérias-primas e dos queijos durante todo o processamento. Entretanto, a presença de *Staphylococcus* DNase positivos em uma das produções de T3 pode ter sido decorrente de contaminação durante a sua produção. Por outro lado, a legislação brasileira não menciona limites máximos para *Staphylococcus* coagulase positivos em leite tipo A pasteurizado (BRASIL, 2002) e a presença de *Staphylococcus* spp. foi detectada em amostragens de leites de outros ensaios, com contagens máximas de 3 log ufc/ml, 1,3 log ufc/ml e 3,11 log ufc/ml para os leites de um ensaio dos queijos T1, T2 e T3, respectivamente (tabela 14). Dessa forma, também é possível que células injuriadas de *Staphylococcus* DNase positivos que não puderam ser detectadas pela análise estivessem presentes no leite utilizado para a produção dos queijos T3, nos quais o microrganismo foi detectado.

Embora tenham sido observadas contagens de bolores e leveduras em algumas amostras de leite utilizadas para elaboração dos queijos T1, T2 e T3, é mais provável que o aparecimento desses microrganismos durante o armazenamento dos queijos tenha sido decorrente da sua presença no ambiente durante a fabricação. De qualquer modo, as contagens de bolores e leveduras estiveram abaixo do limite exigido pela legislação (BRASIL, 1996) durante o armazenamento de todos os queijos produzidos neste trabalho.

4.2.4. Textura instrumental

A figura 4 mostra a curva típica de análise do perfil de textura, bem como o modo de obtenção dos parâmetros, através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems), a partir de amostra do tratamento T2, em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). Curvas semelhantes foram obtidas para as amostras dos queijos T1 e T3.

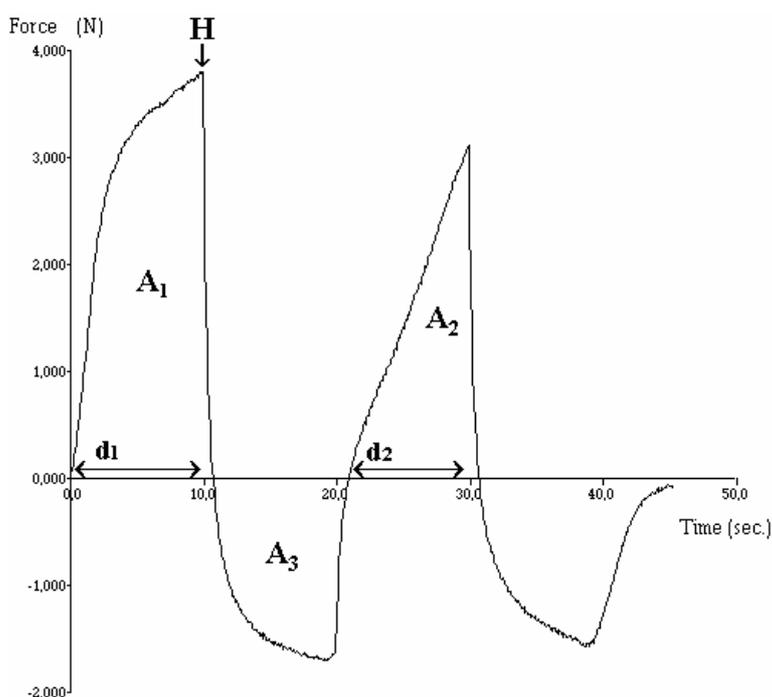


Figura 4: Gráfico da análise do perfil de textura obtido para o queijo T2 (simbiótico), após 1 dia de fabricação, empregando-se o analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems) e o programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Firmeza = força (N) atingida em H; Coesividade = razão entre as áreas A_2 e A_1 ; Adesividade = trabalho em A_3 ; Elasticidade = razão entre d_2 e d_1 ; Gomosidade = força (N) em $H \times (A_2/A_1)$.

A textura é considerada um dos quatro fatores de qualidade dos produtos alimentares, sendo os outros três o sabor, a aparência e o valor nutricional (MESSENS *et al.*, 2000). Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, com a função de simular a mastigação entre

os molares. No teste de dupla compressão, utilizado no presente trabalho, 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 - firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e secundários - fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade, que compõe as características mecânicas dos queijos (FOX *et al.*, 2000).

A tabela 20 mostra as médias obtidas para os parâmetros firmeza, coesividade, adesividade (em módulo), elasticidade e gomosidade dos queijos T1, T2 e T3. Os valores médios de firmeza, adesividade e gomosidade dos queijos T1, T2 e T3 ao longo do armazenamento apresentaram grande variação entre os 5 ensaios realizados para cada queijo e, portanto, os desvios-padrão desses parâmetros foram bastante elevados.

Tabela 20: Perfil de textura (média \pm desvio-padrão)¹ dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Queijo	Dias	Firmeza (N)	Coesividade	Adesividade ² (N s)	Elasticidade	Gomosidade (N)
T1	1	5,16 \pm 3,37 ^{Aa}	0,546 \pm 0,053 ^{Aa}	13,78 \pm 9,58 ^{Aa}	0,855 \pm 0,059 ^{Aa}	2,90 \pm 2,09 ^{Aa}
	7	7,95 \pm 5,59 ^{Ab}	0,501 \pm 0,045 ^{Aab}	18,91 \pm 12,39 ^{Ab}	0,861 \pm 0,059 ^{Aa}	3,98 \pm 3,01 ^{Ab}
	14	9,75 \pm 6,90 ^{Ac}	0,499 \pm 0,076 ^{Ab}	23,25 \pm 17,75 ^{Ac}	0,879 \pm 0,037 ^{Aa}	4,88 \pm 3,30 ^{Abc}
	21	10,23 \pm 7,14 ^{Ac}	0,487 \pm 0,088 ^{Ab}	22,32 \pm 14,29 ^{Ac}	0,897 \pm 0,057 ^{Ab}	4,94 \pm 3,13 ^{Ac}
T2	1	3,00 \pm 1,97 ^{Aa}	0,547 \pm 0,040 ^{Aa}	10,23 \pm 6,97 ^{Aa}	0,899 \pm 0,008 ^{Aa}	1,68 \pm 1,21 ^{Aa}
	7	5,27 \pm 2,80 ^{Ab}	0,547 \pm 0,032 ^{Aab}	19,41 \pm 10,27 ^{Ab}	0,892 \pm 0,032 ^{Aa}	3,24 \pm 1,92 ^{Ab}
	14	5,78 \pm 2,72 ^{Ac}	0,530 \pm 0,027 ^{Ab}	20,98 \pm 9,60 ^{Ac}	0,904 \pm 0,008 ^{Aa}	3,11 \pm 1,57 ^{Abc}
	21	5,62 \pm 2,58 ^{Ac}	0,523 \pm 0,028 ^{Ab}	21,16 \pm 9,73 ^{Ac}	0,904 \pm 0,013 ^{Ab}	2,98 \pm 1,49 ^{Ac}
T3	1	4,90 \pm 3,12 ^{Aa}	0,525 \pm 0,040 ^{Aa}	9,58 \pm 5,05 ^{Aa}	0,856 \pm 0,061 ^{Aa}	2,64 \pm 1,80 ^{Aa}
	7	7,14 \pm 4,67 ^{Ab}	0,481 \pm 0,032 ^{Aab}	13,03 \pm 6,46 ^{Ab}	0,882 \pm 0,042 ^{Aa}	3,55 \pm 2,57 ^{Ab}
	14	8,94 \pm 6,87 ^{Ac}	0,462 \pm 0,091 ^{Ab}	14,62 \pm 8,69 ^{Ac}	0,868 \pm 0,057 ^{Aa}	4,03 \pm 3,23 ^{Abc}
	21	9,37 \pm 7,96 ^{Ac}	0,470 \pm 0,106 ^{Ab}	15,54 \pm 10,89 ^{Ac}	0,896 \pm 0,039 ^{Ab}	4,31 \pm 3,82 ^{Ac}

¹ Médias de 5 ensaios (4 a 6 amostras de cada queijo por período de análise).

² Valores em módulo.

^{A,B} sobreescritas na mesma coluna indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos.

^{a,b,c} sobreescritas na mesma coluna, para cada tratamento, indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento.

Os queijos T1, T2 e T3 não diferiram significativamente entre si quanto à firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade durante os 21 dias de armazenamento ($p>0,05$).

A firmeza é a força necessária para realizar uma determinada deformação, podendo ser definida também como a força requerida para comprimir o alimento entre os dentes molares ou entre a língua e o palato (SZCZESNIAK, 1998; FOX *et al.*, 2000). Os queijos T1, T2 e T3 apresentaram aumentos significativos ($p<0,05$) da firmeza nas três primeiras semanas de armazenamento, permanecendo estáveis, sem variação significativa ($p>0,05$) entre o 14^o e o 21^o dia (tabela 20).

A coesividade é a resistência das ligações internas, ou seja, a quantidade de deformação que o alimento sofre antes de sua ruptura quando comprimido com os molares (SZCZESNIAK, 1998; FOX *et al.*, 2000). Os valores de coesividade dos queijos T1, T2 e T3 apresentaram-se bastante próximos no 1^o dia de armazenamento, com uma pequena, porém significativa, diminuição aos 14 dias de armazenamento ($p<0,05$).

A adesividade é definida como o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e outras superfícies em que o alimento entra em contato, ou ainda, a força requerida para remover o alimento que aderiu ao céu da boca, geralmente o palato, mas também lábios e dentes durante a mastigação (SZCZESNIAK, 1998; FOX *et al.*, 2000). A adesividade, em módulo, dos queijos T1, T2 e T3 aumentou significativamente nas três primeiras semanas de armazenamento ($p<0,05$). Para todos os queijos, o aumento da adesividade foi maior entre o 1^o e o 7^o dia de armazenamento (tabela 20).

A elasticidade é a razão na qual um material deformado volta a sua condição não deformada após remoção da força de deformação (FOX *et al.*, 2000). Houve um discreto aumento da elasticidade dos queijos T1, T2 e T3 entre o 1^o e o 21^o dia de armazenamento (tabela 20), sendo esta variação significativa apenas na última semana de amostragem ($p<0,05$).

A gomosidade é definida como a energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido a um estado pronto para ser deglutido, sendo um produto da firmeza pela coesividade (SZCZESNIAK, 1998). Uma vez que os valores de coesividade dos queijos T1, T2 e T3 foram bastante próximos, com alteração muito pequena durante o armazenamento (mantendo-se ao redor de 0,5 para os três tratamentos), os valores obtidos para gomosidade foram praticamente a

metade dos valores obtidos para firmeza durante o mesmo período. Houve um aumento significativo da gomosidade entre 1 e 7 dias de armazenamento ($p < 0,05$) e um novo aumento significativo aos 21 dias ($p < 0,05$) em comparação às duas primeiras semanas de amostragens (tabela 20).

Segundo SANCHEZ *et al.* (1996), a fonte e o teor de gordura, a quantidade de sólidos não lácteos, o pH, entre outros fatores, exercem influência nas características de textura de produtos similares aos “cream-cheeses”. Por outro lado, BREIDINGER & STEFFE (2001) reportam que as propriedades reológicas de produtos espalháveis (em pasta) de base lipídica são determinadas, não simplesmente pela quantidade total de gordura presente, mas também pela quantidade contida na forma cristal e líquida e esse conceito pode ser aplicado a “cream-cheeses”. Os autores ainda argumentam que a influência de estabilizantes e modificadores de textura podem ser fatores mais importantes que as características de emulsão e propriedades de fase dos lipídios.

No presente trabalho, os parâmetros firmeza, adesividade e gomosidade dos queijos T1, T2 e T3 foram influenciados pelo teor de gordura presente, uma vez que o alto desvio-padrão apresentado pelos parâmetros citados foi decorrente da variação da composição centesimal desses queijos, resultado do emprego de leite que diferiu quanto à composição ao longo dos ensaios realizados neste trabalho. Por outro lado, tais diferenças não interferiram nos valores de coesividade e elasticidade que apresentaram baixa variação entre os 5 ensaios de cada queijo (tabela 20). Cabe aqui enfatizar que os dados instrumentais de coesividade e elasticidade, que apresentaram os menores valores de desvio-padrão, além da gomosidade, não poderiam ter sido obtidos através do teste de simples compressão, justificando, dessa forma, o emprego do teste de dupla compressão no presente trabalho.

Além do teor lipídico, a inulina também é capaz de atuar como modificador de textura em produtos alimentícios, embora não tenha interferido significativamente ($p > 0,05$) na textura instrumental dos queijos T2 (tabela 20). A funcionalidade tecnológica da inulina está baseada no seu efeito em soluções aquosas em vários níveis de sólidos. Em baixas concentrações, a inulina causa significativo aumento da viscosidade e pode ser utilizada como um modificador reológico. Em concentrações de 40-45% forma-se um gel de inulina que é firme, mas com a sensação cremosa oferecida pelos lipídios (MURPHY, 2001).

ROBINSON (1995) estudou o emprego de inulina em iogurte nas concentrações de 1%, 5% e 10% em comparação ao iogurte controle, sem a adição de inulina. Naquele estudo foram verificados valores próximos de força de penetração e de viscosidade entre o iogurte controle e as amostras com 1%, 5% e 10% de inulina. Segundo o autor, os valores daqueles parâmetros obtidos para o iogurte controle foram inteiramente dependentes da resistência suportada pelas pequenas porções de coágulo e a adição da inulina resultou em um pequeno impacto geral no produto.

O efeito de três diferentes concentrações de inulina (5%, 7% e 9%) na textura de sorvete de iogurte (yog-ice cream) com teor reduzido de gordura foi estudado por EL NAGAR *et al.* (2002). Os autores verificaram que as amostras com adição de inulina apresentaram valores de firmeza mais baixos em comparação às amostras controles com teor reduzido de gordura. No entanto, os autores também observaram que, para todas as concentrações de inulina empregadas, os valores de firmeza foram mais altos que os obtidos para as amostras controle com elevado teor gordura.

MENDOZA *et al.* (2001) verificaram que a adição de inulina em lingüiça seca fermentada com baixo teor de gordura proporcionou uma melhoria da textura do produto, que se apresentou mais macia, porém com elasticidade e adesividade similares às de lingüiças convencionais.

4.2.5. Determinação de açúcares e de frutanos

As porcentagens de frutanos, sacarose, frutose, glicose e galactose das amostras de Raftiline® HP-Gel e de queijo T2, após 1 e 21 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, estão apresentadas na tabela 21.

Tabela 21: Teor de frutanos e açúcares obtidos para a inulina Raftiline® HP-Gel e para as amostras de queijo T2 (simbiótico), congeladas após 1 e 21 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Carboidratos ¹	Amostras		
	Raftiline HP-Gel (98% matéria seca)	Queijo T2 - 1 dia ²	Queijo T2 - 21 dias ³
Frutanos (%)	95,2 ± 1,61	7,32 ± 0,392 ^A	7,27 ± 0,357 ^A
Sacarose (%)	0,0274 ± 0,0065	0,0012 ± 0,0014 ^A	0,0014 ± 0,0018 ^A
Frutose (%)	0,108 ± 0,048	0,0113 ± 0,0048 ^A	0,0276 ± 0,0289 ^A
Glicose (%)	0,0057 ± 0,0037	0,255 ± 0,030 ^A	0,146 ± 0,020 ^B
Galactose (%)	0,000	0,914 ± 0,065 ^A	1,03 ± 0,118 ^A

¹ Teor na matéria úmida.

² Valores médios de 4 ensaios.

³ Valores médios de 3 ensaios.

^{A,B} sobrescritas na mesma linha indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento dos queijos T2.

Observou-se o teor médio de 95,2% de frutanos nas amostras de Raftiline® HP-Gel. Este resultado encontrou-se ligeiramente abaixo do teor de frutanos declarado no laudo de análise desse produto pelo fabricante, 97,9% (99,9% na matéria seca).

Nas amostras de queijos T2 após 1 e 21 dias de armazenamento foram identificados teores médios de frutanos bastante próximos, 7,32% e 7,27%, respectivamente, porém 7% abaixo do teor teoricamente contido em 8% de Raftiline® HP-Gel que foi adicionado a esse queijo, de acordo com o laudo de análise do fabricante (7,83% de frutanos, descontando a umidade da fibra). Não houve diferença significativa entre os teores de frutanos, sacarose, frutose e galactose ao 1º e ao 21º dias de armazenamento dos queijos T2 ($p > 0,05$). Por outro lado, observou-se uma diminuição significativa do teor de glicose das amostras dos queijos T2 após 1 e 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Tais resultados indicam que o metabolismo das bactérias “starter” e probiótica adicionadas, além das condições de pH, não ocasionaram a degradação dos frutanos durante o armazenamento dos queijos T2. Dessa forma, os queijos simbióticos T2 apresentaram teor de frutanos superior a 7g / 100g, quantidade suficiente para conferir potencial prebiótico ao longo de todo o armazenamento desses produtos.

4.2.6. Análise sensorial

As notas distribuídas aos queijos T1, T2 e T3 de acordo com a preferência dos provadores na análise sensorial e as diferenças significativas obtidas entre os três tratamentos são mostradas na tabela 22. A ficha do teste de ordenação-preferência utilizada na análise sensorial dos queijos estudados, assim como a ficha para recrutamento de provadores, são apresentadas nos Anexos 3 e 4.

A análise sensorial indicou que o queijo probiótico T1 apresentou a menor preferência pelos provadores (4 notas 1; 23 notas 3) e diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos queijos simbiótico T2 e controle T3. A maior preferência foi obtida pelos queijos T2 (21 notas 1; 6 notas 3), seguida de T3 (19 notas 1; 15 notas 3), porém tal diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 22: Distribuição das notas de acordo com a preferência dos provadores (n=44) na análise sensorial dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle).

Queijos	Notas*			Somadas das ordens**
	1	2	3	
T1	4	17	23	106 ^a
T2	21	17	6	74 ^b
T3	19	10	15	84 ^b

* 1 = preferido, 2 = intermediário, 3 = menos preferido.

** Soma das ordens de cada amostra = $(1 \times n^{\circ} \text{ de notas } 1) + (2 \times n^{\circ} \text{ de notas } 2) + (3 \times n^{\circ} \text{ de notas } 3)$

a, b – letras minúsculas sobrescritas indicam as diferenças significativas apresentadas entre os queijos ($p < 0,05$).

Os provadores indicaram os atributos sensoriais que contribuíram para a escolha das amostras preferida e menos preferida. Tais indicações compreendiam os atributos sabor, textura, aroma e/ou aparência. Em alguns casos um único provador mencionou dois ou mais atributos para aquelas amostras e, dessa forma, o número de citações obtidas foi superior ao número de provadores que preferiram ou não a amostra. Tais informações são apresentadas nas tabelas 23 e 24.

Tabela 23: Atributos sensoriais que contribuíram para a preferência dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na opinião dos provadores.

Queijos	Provadores	Atributos citados				Total
		Sabor	Textura	Aroma	Aparência	
T1	4	4	0	0	0	4
T2	21	17	16	2	1	36
T3	19	17	6	1	0	24

Tabela 24: Atributos sensoriais que contribuíram para a menor preferência dos queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na opinião dos provadores.

Queijos	Provadores	Atributos citados				Total
		Sabor	Textura	Aroma	Aparência	
T1	23	21	5	1	2	29
T2	6	3	2	0	0	5
T3	15	13	1	1	0	15

Os 23 provadores que escolheram T1 como a amostra menos preferida forneceram um total de 29 citações, das quais 72,4% (n = 21) foram relacionadas ao sabor do queijo, que segundo esses provadores apresentava-se bastante ácido (tabela 24). A textura apareceu em 17,2% (n = 5) das citações relacionadas à menor preferência pelos queijos T1 e a aparência e o aroma em, respectivamente, 6,9% (n = 2) e 3,4% (n = 1) das citações (tabela 24). Os 4 provadores que preferiram os queijos T1 citaram que o atributo sabor contribuiu para a escolha por se destacar dos demais queijos, não mencionando qualquer outro atributo (tabela 23).

Foram obtidas 36 citações de atributos pelos 21 provadores que indicaram a preferência pelos queijos T2, sendo que 47,2% (n = 17) das citações foram relacionadas ao sabor e 44,4% (n = 16) à textura (tabela 23). De acordo com os relatos obtidos desses provadores, os queijos T2 apresentaram sabor mais suave, maior cremosidade, espalhabilidade e melhor consistência quando comparados aos queijos T1 e T3. A aparência e o aroma apareceram, respectivamente, em apenas 5,6% (n = 2) e 2,8% (n = 1) das citações referentes à preferência pelos queijos T2 (tabela 23). Somente cinco dos seis provadores que apontaram a menor preferência pelos queijos T2 relataram os atributos que contribuíram para essa escolha, sendo 3 citações para o sabor e 2 citações para a textura (tabela 24).

A preferência pelos queijos T3 também foi justificada pelo sabor que apareceu em 71% (n = 17) de 24 citações obtidas (tabela 23). Para a maior parte desses provadores, os queijos T3 apresentaram sabor mais suave, menos ácido e mais “característico de queijo” em relação à T1 e T2. A textura apareceu em 25% (n = 6) das citações relacionadas à preferência pelos queijos T3 e o aroma em apenas 4% (n = 1) (tabela 23). Por outro lado, o sabor também contribuiu para a menor preferência pelos queijos T3 de acordo com 13 provadores (88% de 14 citações), seguido pela textura e aroma, ambos atributos com apenas 1 citação (tabela 24).

O atributo sabor teve maior importância tanto na escolha das amostras “preferidas” como das “menos preferidas” pelos participantes da análise sensorial. Por outro lado, os provadores (n = 16) indicaram uma redução da firmeza dos queijos T2 contendo inulina, que foi considerada favorável, uma vez que resultou em um queijo mais macio, embora essa diferença não tenha sido significativamente observada nos parâmetros de textura instrumental analisados ($p > 0,05$).

Embora os provadores tenham destacado que os queijos T1 diferiram dos queijos T2 e T3 por apresentarem sabor mais ácido, essa diferença não foi observada nas análises de pH e acidez titulável para os queijos T1. Nesse sentido, existe a possibilidade de a bactéria *Lactobacillus paracasei* ter produzido outros compostos que influem no sabor do queijo, como peptídios, cetonas ou aldeídos. O sabor resultante da presença desses componentes, geralmente amargo, pode ter sido interpretado como “ácido” pelos provadores, ocasionando as diferenças significativas entre os queijos T1 e T3 na análise sensorial (como a análise foi conduzida com um painel consumidor não treinado, é provável que esses provadores, involuntariamente, substituam expressões no momento caracterizar um determinado atributo). Os compostos que interferem no sabor foram provavelmente produzidos pela bactéria probiótica durante a fabricação do queijo na etapa de fermentação, em que o leite foi mantido a 42°C, resultando em um ambiente adequado para um aumento do metabolismo microbiano.

Além disso, a diminuição do teor de gordura decorrente da adição da inulina nos queijos T2 teria minimizado a percepção do sabor de outros compostos possivelmente produzidos por *Lactobacillus paracasei*, tornando o sabor desses queijos mais agradável em relação a T1 e comparável ao de T3. Segundo DEVEREUX *et al.* (2003), existe uma diminuição da percepção do sabor em

alimentos com menor teor de gordura quando comparados aos seus similares sem a redução do teor lipídico devido à ausência de alguns compostos lipossolúveis que são liberados durante a mastigação e que contribuem para o sabor geral do alimento.

Ao contrário do observado no presente trabalho para os queijos T1, a adição de cepas do grupo *Lactobacillus casei* / *paracasei* em queijos tem sido correlacionada com 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*.

GARDINER *et al.* (1998) e STANTON *et al.* (1998) reportaram que as altas contagens 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 pelo nosso grupo de pesquisa, 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°C, (BURITI *et al.*, 2005).

5. CONCLUSÕES

- A cultura de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 (Danisco) permaneceu viável, com contagens sempre superiores a 7 log ufc/g, ao longo de 21 dias de armazenamento dos queijos T1 e T2, que podem, dessa forma, serem classificados como potencialmente probióticos. Do mesmo modo, o teor inicial de frutanos permaneceu inalterado durante todo o armazenamento dos queijos T2, quantidade superior a 7g / 100g, o que resultou em um alimento simbiótico em potencial.
- O emprego de *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com o microrganismo “starter” *Streptococcus thermophilus* em queijo fresco cremoso não promoveu alterações nas características físico-químicas (pH, acidez titulável, umidade e aw) e de textura.
- A adição de *Lactobacillus paracasei* em queijo fresco cremoso resultou em modificação sensorial pela alteração do sabor em relação ao queijo controle (sem probiótico), refletindo na menor preferência dos provadores por esse queijo ($p < 0,05$). Por outro lado, a adição complementar de inulina permitiu que essa alteração sensorial não fosse percebida, de forma que não foi observada na análise sensorial, sem produzir mudança significativa quando comparado ao queijo controle ($p > 0,05$).
- A incorporação da inulina no queijo fresco cremoso não alterou as características físico-químicas e o comportamento global dos parâmetros de textura instrumental do queijo durante o armazenamento. No entanto, a adição de inulina resultou em um produto mais macio, característica que foi sensorialmente percebida e apreciada pelos provadores, embora tal diferença não tenha sido estatisticamente observada nos parâmetros de textura instrumental analisados ($p > 0,05$).
- Os queijos T1 e T2, adicionados da cultura probiótica, apresentaram menores contagens de coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* DNase positivos e diferiram significativamente em relação ao queijo controle ($p < 0,05$),

indicando um efeito inibitório do *Lactobacillus paracasei* sobre aqueles microrganismos.

- O ingrediente prebiótico inulina pode ser utilizado juntamente com a bactéria probiótica *Lactobacillus paracasei* para a produção de queijo fresco cremoso com características adequadas e com propriedades funcionais agregadas, resultando em um produto com boas perspectivas para uma futura industrialização e comercialização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Recomendações da comissão já aprovadas pela Diretoria de Alimentos em Toxicologia. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em: 20 dez. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 18 jan. 2005.

ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e ou em co-cultura em queijo Minas frescal. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.61, 2002a. Res.ALN42. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).

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. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.61, 2002b. Res.ALN41. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).

* De acordo com a NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2001.

- ARICI, M.; BILGIN, B.; SAGDIC, O.; OZDEMIR, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiol.**, London, v.21, p.19-24, 2004.
- ASSIS, E.G.; ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Perfil microbiológico de queijo minas frescal processado com a adição de cultura probiótica e armazenado sob refrigeração. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.53, 2002. Res.ALN26. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimentos sob inspeção federal**. São Paulo, 2002. [Comunicação].
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2003a. v.1, p.12.1-12.3.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2003b. v.2, p.33.1-33.88.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 2003. 401p.
- BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.80, p.1520-1527, 1997.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, 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. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.79, p.8-15, 1996.
- BRASIL. Portaria n.146 de 07 de março de 1996. O Ministério de Estado da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária institui o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar.1996. Seção 1.
- BRASIL. Instrução Normativa n.5 51 de 18 de setembro de 2002. O Ministro de Estado da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária resolve aprovar os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002.

- BREIDINGER, S.L.; STEFFE, J.F. Texture map of cream cheese. **J. Food Sci.**, Chicago, v.66, n.3, 2001.
- 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. **Rev. Bras. 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*. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Amsterdam, v.38, n.2, p.173-180, 2005.
- 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. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, [no prelo].
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. São Paulo: Artmed, 2003. 255p.
- CANO, P.G.; PERDIGÓN, G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v.70, p.433-440, 2003.
- CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.30, p.268-282, 1999.
- CARDARELLI, H.R.; FEBBO, C.; SAAD, S.M.I. Monitoramento de parâmetros de textura instrumental em queijo "petit-suisse" probiótico ao longo de sua vida de prateleira. In: **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.39, supl.3, p.147-149, 2003. TALN09 (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 8, São Paulo, 2003).
- CÉRANTOLA, S.; KERVAREC, N.; PINCHON, R.; MAGNÉ, C.; BESSIERES, M.A.; DESLANDES, E. NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.339, n.14, p.2445-2449, 2004.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, Oxford, v.51, n.4, p.123-136, 1998.
- COLLINS, M.D.; PHILLIPS, B.A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.39, p.105-108, 1989 *apud* STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.36, p.1-29, 1997.

- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.
- COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
- CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. 3.ed. New York: Wiley, 2001. 124p.
- CRITTENDEN, R.G. Prebiotics. In: TANNOCK, G.W. **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific, 1999. p.141-156.
- DALGLEISH, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P.F., ed. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1993. v.1, p.69-100.
- DELLAGLIO, F.; FELIS, G.E.; TORRIANI, S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins *et al.* 1989. Request for an opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v.52, p.285-287, 2002.
- DEVEREUX, H.M.; JONES, G.P.; McCORMACK, L.; HUNTER, W.C. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **J. Food Sci.**, Chicago, v.68, n.5, p.1850-1854, 2003.
- DICKS, I.M.T.; PLESSIS, E.M.; DELLAGLIO, F.; LAUER, E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev. designation of ATCC 334 as the Neotype of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.46, n.1, p.337-340, 1996.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.77, p.2854-2864, 1994.
- EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICĂ, M.; KURI, V.; BRENNAN, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **Int. J. Dairy Technol.**, Oxford, v.55, n.2, p.89-93, 2002.
- FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F.; MIZZI, L.; TORRIANI, S. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a gänge in the taxonomy of *Lactobacillus casei* group. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v.51, p.2113-2117, 2001.
- 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].

- FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.9, p.53-61, 1999.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.64, p.2192-2199, 1998.
- GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward indentifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.391S-394S, 2000.
- GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied dairy microbiology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.81, p.37-47, 1998.
- GOMES, A.M.P.; VIEIRA, M.M.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **J. Food Eng.**, Oxford, v.36, p.281-301, 1998.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.
- GREGER, J.L. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, suppl. 7, p.1434S-1435S, 1999.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, London, v.360, p.512-518, 2003.
- GUÉRIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYITT, O.; ANDRIEUX, C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in health infants. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.67, p.111-117, 1998.
- GUÉRIN-DANAN, C.; MESLIN, J.C.; CHAMBARD, A.; CHARPILLENNE, A.; RELANO, P.; BOULEY, C.; COHEN, J.; ANDRIEUX, C. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 011 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.111-117, 2001.

- HALSTED, C.H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda, v.77 (suppl.), p.1001S-1007S, 2003.
- HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Amsterdam, v.37, p.461-466, 2004.
- HELLER, K.J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; DeVRESE, M. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC, 2003. p.203-225.
- HOEBREGS, H. Fructans in foos and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative estudy. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.80, n.5, p.1029-1036, 1997.
- HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. p.99-131.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.
- HORI, T.; KIYOSHIMA, J.; SHIDA, K.; YASUI, H. Argumentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.9. n.1, p.105-108, 2002.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: IAL, 1985. 533p.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, Amsterdam, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K.S.H.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. **Int. J. Dairy Technol.**, Oxford, v.56, n.4, p.203-210, 2003.
- JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6.ed. Gaithersburg: Aspen, 2000. 679p.
- JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods. Biochemical & processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998. p.357-381.
- 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.

- 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 Res. Int.**, Amsterdam, 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. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.12, p.757-764, 2002.
- KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci.**, Bangalore, v.27, p.703-714, 2002.
- KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2nd. ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811.
- KORHONEN, H. Technology options for new nutritional concepts. **Int. J. Dairy Technol.**, Oxford, v.55, n.2, p.79-88, 2002.
- KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.40, n.1, p.411-416, 2005.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.13, p.517-528, 2003.
- 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 Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.
- LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.
- MARTIN, S.E.; MYERS, E.R. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; GORHAM, J.R.; MURREL, K.D.; CLIVER, D.O., ed. **Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1994. v.1. p. 345-394.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.
- Mc BREARTY, S.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; WALLACE, J.M.; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.599-610, 2001.

- MÉDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.14, p.611-618, 2004.
- MENDOZA, E.; GARCÍA, M.L.; CASAS, C.; SELGAS, M.D. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.57, p.387-393, 2001.
- 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. **Int. J. Food. Microbiol.** Amsterdam, v.59, p.37-46, 2000.
- MESSENS, W.; VAN de WALLE, D.; AREVALO, J.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.10, p.359-367, 2000.
- MINELLI, E.B; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.14, n.8, p.723-736, 2004.
- MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.85, suppl.1, p. S47-S53, 2001.
- NETER, J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIM, C.J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**. 4.ed. Boston: McGraw-Hill, 1996. p.1010-1194.
- NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, suppl.7, p.1402S-1406S, 1999.
- NODA, P.K.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Avaliação de um teste rápido para pesquisa de *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.39, supl.3, p.66, 2003. Res. ALN64 (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 8, São Paulo, 2003).
- 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. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.9, p.43-52, 1999.

- PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, Philadelphia, v.37, n.4, p.259-281, 2002.
- ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, suppl.7, p.1398S-1401S, 1999a.
- ROBERFROID, M.B. Caloric value of inulin and oligofructose. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, suppl.7, p.1436S-1437S, 1999b.
- ROBERFROID, M.B. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. **Nutrition**, New York, v.16, n.7/8, p.677-679, 2000.
- ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.87, suppl.2, p.S139-S143. 2002.
- ROBINSON, R.K. The potential of inulin as a functional ingredient. **Br. Food. J.**, Northbank, v.97, n.4, p.30-32, 1995.
- ROCHA, J.S.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Microbiologia de queijo minas frescal probiótico contendo *L. acidophilus*. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.63, 2002. Res.ALN45. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Necessidade de reavaliação da padronização, qualidade e comercialização de queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. 1CD. Res. MAL-102.
- ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.785-793, 1997.
- RUPÉREZ, P.; BRAVO, L. Oligofructanos y gomas. In: LAJOLO, F.M.; SAURACALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. **Fibra dietética en Ibero-América: tecnología y salud – obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p.61-75.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.
- SANCHEZ, C.; BEAUREGARD, J.L.; CHASSAGNE, M.H.; BIMBENET, J.J.; HARDY, J. Effects of processing on rheology and structure of double cream cheese. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.28, n.6, p.547-552, 1996.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SCHNEEMAN, B.O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, suppl.7, p.1424S-1427S, 1999.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.349-356, 1997.
- SHIROSE, I.; MORI, E.E.M. **Estatística aplicada à análise sensorial: módulo 1**. Campinas: ITAL, 1994. 73p. [Manual Técnico, n.13].
- SOLER, J.M.P.; YAMAGUCHI, A.M. **Relatório de análise estatística sobre o projeto “Desenvolvimento de queijo fresco simbiótico”**. São Paulo: IME-USP, 2004. 75p. [Relatório 04P22].
- STANDARD methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 546p.
- STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.491-497, 1998.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.36, p.1-29, 1997.
- SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling historical and scientific perspectives. **Food Technol.**, Chicago, v.52, n.8, p.54-57, 1998.
- TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Haywards Heath, v.8, n.15, p.692-700, 2003.
- VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.85, p.721-729, 2002.
- 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. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.83, p.1905-1911, 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 Res. Int.**, Amsterdam, v.36, p.895-904, 2003.
- ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.

ANEXO 1 – Aprovação da análise sensorial do presente trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 95

São Paulo, 06 de agosto de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Flávia Carolina Alonso Buriti

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 04 de agosto passado, **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento de queijo fresco simbiótico" (Protocolo nº 196) 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 PortaVice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT

ANEXO 2 – Resultados da análise estatística para os microrganismos indicadores de contaminação

Tabela A.1: Teste binomial exato* para a proporção de contagens de coliformes totais, *Staphylococcus* DNase positivos e bolores e leveduras acima do limite de sensibilidade de medição obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, considerando $p < 0,05$.

Queijos	Microrganismos	Total de amostragens	Medições acima do limiar de sensibilidade	Proporção da amostra	Nível descritivo (p valor)
T1	Coliformes	40	2	0,050	0,60
	<i>Staphylococcus</i> DNase+	19	0	0,000	1,00
	Bolores e leveduras	40	1	0,025	0,87
T2	Coliformes	40	2	0,050	0,60
	<i>Staphylococcus</i> DNase+	9	0	0,000	1,00
	Bolores e leveduras	40	2	0,050	0,60
T3	Coliformes	29	7	0,241	0,00
	<i>Staphylococcus</i> DNase+	12	5	0,417	0,00
	Bolores e leveduras	29	1	0,034	0,99

* Hipótese do teste: proporção das contagens maiores que o limite de sensibilidade é menor ou igual a 5%.

Tabela A.2: Teste binomial exato* para a proporção de contagens de *Staphylococcus* spp. acima do limite de sensibilidade de medição obtidas para os queijos T1 (probiótico), T2 (simbiótico) e T3 (controle) na massa-base de queijo fresco (dia 0) e no produto final após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, considerando $p < 0,05$.

Queijos	Total de amostragens	Medições acima do limiar de sensibilidade	Proporção da amostra	Nível descritivo (p valor)
T1	40	16	0,400	0,92
T2	40	16	0,400	0,92
T3	29	25	0,862	0,00

* Hipótese do teste: proporção das contagens maiores que o limite de sensibilidade é menor ou igual a 50%.

ANEXO 3 – Modelo da ficha utilizada na análise sensorial

Análise sensorial

Ficha para teste de ordenação – preferência

Nome: _____ Data: 01/04/2004

Produto: queijo fresco cremoso

Você está recebendo 3 amostras de queijo fresco cremoso.

Prove as amostras da esquerda para direita. Utilize um biscoito água para acompanhar cada uma das amostras.

Agora as ordene de acordo com a sua preferência geral.

	Mais preferida		Menos preferida
Posto	1º lugar	2º lugar	3º lugar
Código =			

Comentários:

Agora, por favor, responda as seguintes questões:

Qual característica sensorial você mais apreciou na amostra mais preferida?

Qual característica sensorial você não apreciou na amostra menos preferida?

Comentários:

Obrigada!

ANEXO 4 – Modelo da ficha utilizada para recrutamento dos participantes da análise sensorial

Recrutamento de provadores para análise sensorial de alimentos

Estamos convidando você para participar de uma análise sensorial de queijo fresco cremoso.

Esta análise será conduzida pela 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 semi-desnatado, fermento láctico (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus paracasei*), cloreto de cálcio, coalho, soro de leite, inulina (fibra industrializada extraída das raízes da chicória), sal e goma xantana.

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 fresco cremoso e ordená-las de acordo com sua preferência. O teste será conduzido no laboratório de Análise Sensorial do Bloco 16. Ao final das análises os provadores receberão um brinde mas não haverá remuneração financeira. Todas as informações serão sigilosas, garantindo a privacidade do provador.

Portanto, se você costuma consumir esse tipo de produto, tem entre 18 e 60 anos e 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.

