

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ORIGEM ANIMAL

CLARA CALIL DA COSTA ALVES

COMPORTAMENTO DA *Escherichia coli* EM QUEIJO
MINAS FRESCAL ELABORADO COM UTILIZAÇÃO DE
Lactobacillus acidophilus E DE ACIDIFICAÇÃO DIRETA
COM ÁCIDO LÁTICO

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2010

CLARA CALIL DA COSTA ALVES

COMPORTAMENTO DA *Escherichia coli* EM QUEIJO MINAS FRESCAL
ELABORADO COM UTILIZAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* E DE
ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO LÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

Co-Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Co-Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO

Niterói

2010

CLARA CALIL DA COSTA ALVES

COMPORTAMENTO DA *Escherichia coli* EM QUEIJO MINAS FRESCAL
ELABORADO COM UTILIZAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* E
ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO LÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ – Orientador
UFF

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
UFF

Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO
UFF

Prof^a. Dr^a. PAULA APARECIDA MARTINS BORGES BASTOS
IFF

Niterói

2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos, por todas as oportunidades e conquistas que me proporcionou. E, principalmente, por colocar pessoas tão especiais em minha vida. Pela minha saúde e de todos da minha família.

A toda a minha família, em especial aos meus pais Ana Cristina Calil da Costa Alves e Antonio da Costa Alves, aos quais devo tudo que sou e que ainda serei, por todo o apoio, atenção, amor e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez, pelos muitos ensinamentos, boa vontade, paciência, incentivo e atenção em todos os momentos que precisei.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Robson Maia Franco por ter me ajudado em todos os eventuais problemas, pela dedicação, paciência e correção criteriosa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Sérgio Borges Mano pelos auxílios e ensinamentos ao longo do curso.

Aos colegas do mestrado e funcionários da UFF que direta ou indiretamente me ajudaram durante o período do mestrado.

Aos amigos pelas palavras de incentivo, carinho e apoio.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 07

LISTA DE TABELAS, p. 09

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 11

RESUMO, p. 13

ABSTRACT, p. 14

1 INTRODUÇÃO, p. 15

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 17

2.1 DEFINIÇÕES, FABRICAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE QUEIJOS, p. 17

2.2 QUEIJO MINAS FRESCAL, p. 22

2.3 CONTAMINAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL POR *E. coli*, p. 23

2.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS, p. 25

2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS PROBIÓTICOS, p. 26

2.6 *Lactobacillus acidophilus*, p. 28

2.7 ACIDIFICAÇÃO DIRETA DO QUEIJO MINAS FRESCAL, p. 30

2.8 ADIÇÃO DE *L. acidophilus* E ÁCIDO LÁTICO EM QUEIJOS, p. 31

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 35

3.1	MATÉRIA PRIMA E INGREDIENTES,	p. 35
3.2	MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVOS,	p. 36
3.3	ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS,	p. 36
3.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FABRICAÇÃO,	p. 39
3.4.1	Composição, densidade e crioscopia do leite,	p. 39
3.4.2	Acidez titulável,	p. 39
3.4.3	Potencial hidrogeniônico (pH),	p. 41
3.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO,	p. 41
3.5.1	Composição,	p. 41
3.5.1.1	Determinação de gordura,	p. 42
3.5.1.2	Determinação de proteína,	p. 42
3.5.1.3	Determinação de cloretos,	p. 44
3.5.1.4	Determinação do Teor de umidade,	p. 44
3.5.1.5	Determinação do teor de cinzas,	p. 45
3.6	ANÁLISES DURANTE A ARMAZENAGEM,	p. 46
3.6.1	Análises físico-químicas,	p. 46
3.6.2	Análises bacteriológicas,	p. 46
3.6.2.1	Número Mais Provável de <i>Escherichia coli</i> ,	p. 46
3.6.2.2	Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	p. 48
3.7	ANÁLISE SENSORIAL,	p. 49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 51

4.1	COMPOSIÇÃO, DENSIDADE E CRIOSCOPIA DO LEITE,	p. 51
4.2	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DURANTE A FABRICAÇÃO,	p. 53
4.3	ACIDEZ TITULÁVEL DURANTE A FABRICAÇÃO,	p. 54
4.4	COMPOSIÇÃO DO QUEIJO,	p. 55
4.5	ACIDEZ TITULÁVEL E pH DURANTE A ARMAZENAGEM,	p. 57
4.6	NMP DE <i>E. coli</i> ,	p. 62
4.7	CONTAGEM DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	p. 66
4.8	ANÁLISE SENSORIAL,	p. 68

5 CONCLUSÕES, p. 71

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 73

7 ANEXOS, p. 80

7.1 FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL, PARA O TESTE DE ACEITAÇÃO SEGUNDO A ESCALA HEDÔNICA DE NOVE PONTOS E A ESCALA DE ATITUDE DE NOVE PONTOS, p. 80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Representação gráfica das formas de industrialização do leite com SIF, no Brasil em 2007, p. 21
- Figura 2 Mexedura da massa do queijo Minas Frescal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 37
- Figura 3 Enformagem do queijo Minas Frescal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 38
- Figura 4 Salga do queijo Minas Frescal, em salmoura a 20% de sal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, p. 38
- Figura 5 Fluxograma de elaboração do queijo Minas Frescal, produzido no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 38
- Figura 6 “Eppendorfs” colocados sob a luz ultravioleta para verificação de fluorescência, no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 48

- Figura 7 Representação gráfica da acidez titulável, em gramas de ácido láctico/100 gramas, ao longo do tempo de estocagem, em diferentes dias , dos queijos T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), p. 58
- Figura 8 Representação gráfica do pH, durante a armazenagem do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), p. 60
- Figura 9 Resultados do NMP de *E. coli* (Log UFC/mL) durante 30 dias de estocagem, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), p. 63
- Figura 10 Queijo Minas Frescal, do tratamento T6 (QMF + *E. coli*), produzido no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 66
- Figura 11 Representação gráfica dos resultados da Contagem de *L. acidophilus* (Log UFC/g) dos queijos que foram adicionados de *L. acidophilus*, T2 (QMF + *L. acidophilus*) e T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), ao longo do tempo de estocagem, p. 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Diferentes tratamentos utilizados na produção do queijo Minas Frescal, no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009, p. 37

TABELA 2 - Resultados da composição (% de gordura, % de lactose, % de sólidos totais, % de proteínas, % de sais minerais), densidade e crioscopia em °H do leite utilizado na fabricação dos queijos, T1(QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação, p. 51

TABELA 3 - Resultados das análises de pH realizadas durante as diferentes fases de fabricação do queijo Minas Frescal. T1(QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), p. 53

TABELA 4 - Resultados da análise de acidez titulável, em gramas de ácido láctico/100 gramas, realizada durante as diferentes fases de fabricação dos queijos Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação, p. 54

TABELA 5 - Teores médios da composição e Gordura no Extrato Seco (GES), em %, dos queijos, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação, p. 55

TABELA 6 - Resultados do NMP de *E. coli* (Log UFC/g) do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), durante 30 dias de estocagem, p. 63

TABELA 7 - Resultados da Contagem de *L. acidophilus* (Log UFC/g) dos queijos que foram adicionados de *L. acidophilus*, T2 (QMF + *L. acidophilus*) e T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), ao longo do tempo de estocagem, p. 67

TABELA 8 - Resultados da análise sensorial pelo teste de aceitação segundo a escala hedônica de nove pontos, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), no sétimo dia de fabricação, p. 68

TABELA 9 - Resultados da análise sensorial, pelo teste de atitude segundo a escala de nove pontos, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), no sétimo dia de fabricação, p. 69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AgNO ₃	Nitrato de Prata;
ANOVA	“Analysis of variance”;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
BAL	Bactérias Ácido-Láticas;
BHI	“Brain Heart Infusion”;
Ca ²⁺	Cálcio;
CaCl ₂	Cloreto de cálcio;
CV	Coeficiente de variação;
°D	Graus Dornic;
°H	Graus Hortvet;
K ₂ CrO ₄	Cromato de Potássio;
Log	Logaritmos;
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
Mm	Micrômetro;
MRS	Man Rogosa e Sharpe;
Na ⁺	Sódio;
NaCl	Cloreto de sódio;
NaOH	Hidróxido de sódio;
nm	Nanômetro;
NMP	Número Mais Provável;
p	Probabilidade;
pH	Potencial hidrogeniônico;

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada;
SSP	Solução Salina Peptonada;
SIF	Serviço de Inspeção Federal;
UFC	Unidades formadoras de colônias;
UFF	Universidade Federal Fluminense.

Resumo

O queijo Minas Frescal apresenta ampla aceitação pelos consumidores e elevado rendimento de fabricação. A presença de microrganismos é frequente e representa prejuízos econômicos e riscos a saúde coletiva. A utilização de microrganismos probióticos e / ou a acidificação direta utilizando ácidos orgânicos pode ser uma alternativa para a melhor conservação dos queijos. O objetivo principal do experimento foi verificar a inibição da *Escherichia coli*, por meio da adição do *Lactobacillus acidophilus* e da adição de ácido láctico. Também foi realizada a caracterização físico-química durante a elaboração, do queijo pronto e durante a estocagem, além da avaliação da qualidade sensorial. Foram fabricadas seis produções diferentes: com e sem adição de ácido láctico, *L. acidophilus* e *E. coli*. Durante a fabricação foram avaliados o pH e a acidez titulável. As amostras dos queijos foram analisadas durante o período de estocagem (30 dias), quanto à composição, acidez e Número Mais Provável de *E. coli* e contagem de *L. acidophilus*. A análise sensorial foi realizada por métodos sensoriais afetivos (teste de aceitação segundo a escala de nove pontos, e teste de aceitação segundo a escala de atitude de nove pontos). A acidez (pH e acidez titulável) não variou consideravelmente durante a elaboração dos queijos. A composição dos queijos nos diferentes tratamentos se encontrava de acordo com os padrões esperados para o produto, com exceção do teor de gordura que foi maior nos queijos com adição de ácido láctico, obtendo-se queijos gordos e até extra gordos. Ocorreu o aumento da acidez e a redução do pH devido à adição de *E. coli* e *L. acidophilus*. A incorporação de *L. acidophilus* reduziu em três ciclos logarítmicos a contaminação por *E. coli*, entretanto nos tratamentos com ácido láctico não ocorreu redução na contaminação. Nos tratamentos sem o microrganismo probiótico, os queijos se encontravam fora dos padrões da legislação a partir do 18º dia de armazenamento. Entretanto, os queijos com *L. acidophilus* permaneceu dentro dos padrões ainda no 30º dia de armazenamento. Durante todo o período de armazenagem as contagens de *L. acidophilus* foram acima de 10^8 UFC/g, caracterizando populações suficientes para classificar o queijo como alimento probiótico. Na análise sensorial, foi constatado que o queijo com a adição do probiótico foi o preferido pelos julgadores. A utilização do *L. acidophilus* foi efetiva na redução das contagens de *E. coli*, e também melhorou a qualidade sensorial dos queijos.

Palavras-chave: Microrganismos probióticos. *Lactobacillus acidophilus*. Queijo Minas Frescal. *Escherichia coli*. Ácido láctico.

Abstract

The Minas Frescal cheese has widespread acceptance among consumers and has great yield of fabrication. The presence of microorganisms is frequent and it represents economic loss and risks to the collective health. The use of probiotic microorganisms and / or direct acidification using organic acids may be an alternative for better preservation of cheeses. The main object of this experiment was to certify the inhibition of *Escherichia coli*, by means of addition of *Lactobacillus acidophilus* and of direct acidification with lactic acid. Furthermore, the physicochemical characterization was carried out during elaboration, both of the cheese as a final product and during the stock period, besides sensory quality evaluation. Six different productions were manufactured: with and without the addition of lactic acid, *L. acidophilus* and *E. coli*. During manufacture process, it was evaluated the titratable acidity and pH. The samples of cheeses were analyzed during the stock period (30 days), referring to composition, acidity and most probable number of *E. coli* e counting of *L. acidophilus*. The sensory analysis was carried out by sensory affective methods (test of acceptance, according to nine points scale, and test of acceptance, according to nine points attitude scale). The acidity (titratable acidity and pH) did not change significantly during the preparation of cheeses. The composition of cheeses in different treatments was in accordance to the standards expected for the product, except for fat content, which was higher in cheese with the addition of lactic acid, obtaining fat cheeses and even extra fat cheeses. The increase of titratable acidity and the reduction of pH occurred due to the addition of *E. coli* e *L. acidophilus*. The incorporation of *L. acidophilus* reduced in three logarithm cycles the contamination by *E. coli*, however, in treatments with lactic acid, the reduction concerning contamination did not occurred. In treatments without the addition of probiotic microorganisms, the cheeses would be out of standard from day 18 of the stock period. However, the cheese which presented *L. acidophilus* was able to maintain the standard of requirements until 30-day of the stock period. During the entire period of stocking, the counting of *L. acidophilus* was above 10^8 UFC/g, characterizing sufficient populations to classify the cheese as a probiotic food. At the sensory analysis, it was attested that the cheese which had the addition of probiotic was the most preferred among the judges. The use of *L. acidophilus* was effective in reducing counts of *E. coli*, and also improved the sensory quality of cheeses.

Keywords: Probiotics. *Lactobacillus acidophilus*. Minas Frescal cheese. *Escherichia coli*. lactic acid.

1 INTRODUÇÃO

A produção de queijos representa uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios, destacando-se o queijo Minas Frescal, que possui ampla aceitação no mercado, excelente rendimento na fabricação e facilidade de produção.

Devido ao alto teor de umidade, elevado valor de pH e grande manipulação durante a fabricação, o queijo Minas Frescal é extremamente suscetível aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as características de qualidade, rendimento e durabilidade. O queijo Minas Frescal, constantemente, apresenta contaminação por diversos patógenos de importância em saúde coletiva, destacando-se a *Escherichia coli*.

No setor láteo, os alimentos funcionais, tais como os adicionados de microrganismos probióticos, são uma realidade e muitas empresas desenvolvem produtos tendo a promoção da saúde como importante estratégia de propaganda. Isso se deve às constantes mudanças no estilo de vida dos consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a saúde e com melhor acesso à informação.

A adição de culturas probióticas tem sido testada em vários tipos de produtos láteos, e a maior parte dos microrganismos consegue permanecer viável, alcançando as características desejáveis no produto final, como por exemplo, inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos. O *Lactobacillus acidophilus* é considerado um microrganismo probiótico, sendo muito utilizado na indústria de laticínios na fabricação de diversos produtos.

A acidificação de queijos utilizando ácido láctico é outra forma de melhorar as características de produção e de preservação, diminuindo as alterações qualitativas, ao longo do tempo de estocagem.

Os objetivos do presente experimento foram fixar os parâmetros de acidez (pH e acidez titulável) durante a elaboração dos queijos nos diferentes tratamentos empregados, realizar a caracterização físico-química do queijo produzido pelo procedimento tradicional, com a adição de probiótico e com a adição de ácido láctico, determinar o pH e a acidez titulável durante o período de estocagem, verificar a inibição da *Escherichia coli* em queijo Minas Frescal, por meio da adição do *Lactobacillus acidophilus* e da acidificação direta com ácido láctico, durante o período de estocagem do queijo (até 30 dias), efetuar a contagem de *L. acidophilus* durante o período de armazenagem e realizar a avaliação sensorial por meio de testes afetivos (teste de aceitação segundo a escala de nove pontos, e teste de aceitação segundo a escala de atitude de nove pontos).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÕES, FABRICAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE QUEIJOS

Segundo a Portaria número 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996):

“Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.”

SCOTT et al. (1998) definiram o queijo como sendo um alimento obtido da coagulação das proteínas do leite ou do soro de leite, por ação de enzimas, acidificação ou ultra-filtração, com a formação de uma massa sólida, podendo ainda ser maturado ou não.

Queijo fresco é classificado como o queijo que está pronto para consumo logo após a fabricação; enquanto que o queijo maturado necessita de alterações bioquímicas e físicas a fim de alcançar as características específicas da variedade do queijo (BRASIL, 2008).

O queijo é uma das formas mais antigas de preservar as características nutricionais do leite, transformando-o em um produto mais estável, palatável, cujas qualidades são mantidas e podem ser padronizadas ou adaptadas às necessidades

do mercado. É um concentrado láteo que apresenta na composição: caseína, gordura, água e pequenas quantidades de lactose, albuminas e sais solúveis do leite. É obtido pela coagulação do leite, pela ação de certas enzimas proteolíticas, ácido láctico produzido por microrganismos ou mesmo pela acidificação direta utilizando ácido láctico (OLIVEIRA; CARUSO, 1996).

Do ponto de vista nutricional, o queijo é considerado um alimento altamente nutritivo devido aos teores de proteína, com grande quantidade de aminoácidos essenciais, lipídeos, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, principalmente as vitaminas A (retinol), D (calciferol) e as do complexo B (como biotina, riboflavina, ácido pantotênico) (OLIVEIRA; CARUSO, 1996; PERRY, 2004; SPREER, 1991).

No Brasil e no mundo, o queijo é um dos produtos láteos que mais se difundiu e um dos que mais sofreu adaptações da técnica de elaboração. Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação ocasionam, conseqüentemente, o surgimento dos vários tipos existentes, cerca de 2.000 tipos no mundo. A tecnologia de fabricação compreende as seguintes etapas básicas: seleção e pasteurização do leite, coagulação do leite, corte da coalhada para liberação do lactosoro, enformagem e prensagem, salga e embalagem (PERRY, 2004; SPREER, 1991).

A boa qualidade microbiológica do leite é fundamental para a preparação de bons queijos. É necessário animais sem mastite, utilização de boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados, resfriamento do leite à temperatura e ao tempo adequados e pasteurização eficiente. O leite contaminado é um problema para a indústria de laticínios, uma vez que se torna mais ácido, resultando em produtos de má qualidade e mais perecíveis (FURTADO, 2005). A contaminação acarreta barreiras não tarifárias para a exportação de laticínios brasileiros, além de constituir risco à saúde da população no país (PERRY, 2004).

Além disso, o leite deve ser livre de contaminação por agentes químicos como antimicrobianos, herbicidas, pesticidas e etc. No caso dos antimicrobianos, se estes forem administrados ao gado, passarão ao leite e poderão inibir a coagulação ou alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica. Deve ter também qualidade sensorial (livre de sabores e odores estranhos) e físico-

química (composição, pH e acidez) de acordo com o esperado (PERRY, 2004; SPREER, 1991).

Mesmo com as modificações durante o tratamento do leite na fabricação do queijo, os valores de pH não variam muito, em virtude do poder tampão do leite. O leite possui fosfatos, citratos, caseína, albumina e dióxido de carbono dissolvido, que mantém os valores de pH em níveis constantes (OLIVEIRA; CARUSO, 1996). O pH do leite normal deve estar entre 6,6 e 6,7 (CORTEZ; CORTEZ, 2008).

A pasteurização pode alterar o equilíbrio salino do leite. Para corrigir o problema pode ser adicionado, conforme a necessidade e o interesse do produtor, o aditivo CaCl_2 , que aumenta o teor de cálcio no leite, repondo o cálcio insolubilizado durante a pasteurização. O CaCl_2 acelera a coagulação da caseína, reduzindo o tempo de coagulação e ajuda a firmar o coágulo (SCOTT et al., 1998; WONG, 1988).

A função do coagulante, utilizado em todos os tipos de queijo, exceto os frescos tipo "cottage", é coagular a caseína presente no leite. A principal enzima responsável pela coagulação é a quimosina, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens (PERRY, 2004).

A coagulação é dependente da temperatura, natureza e concentração das enzimas coagulantes, do pH e das características e composição do substrato. A temperatura ótima de ação do coagulante é em torno de 40°C, mas utilizam-se temperaturas ligeiramente mais baixas (em torno de 35°C) para evitar que a coalhada fique muito dura. A quimosina é a enzima mais específica, rompe determinada fração da caseína, obtendo-se queijos com menores alterações. A enzima coagulante atua melhor em pH mais ácido (sendo o pH ótimo entre 6,2 e 6,5). Quanto maior o conteúdo de caseína e de cálcio no leite, melhor a formação do coágulo (SPREER, 1991).

Outro método de coagulação da caseína é adicionar ácido ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Neste pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam. A adição de ácido fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático (FOX, 2000).

Com a finalidade de atender às necessidades especiais de grupos como os vegetarianos e os muçulmanos, foram desenvolvidos coagulantes de origem vegetal e microbiana. Coagulantes de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos produzidos costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo

de armazenamento. Entretanto, os coagulantes de origem microbiana têm características bastante semelhantes aos de origem animal (PERRY, 2004).

A etapa de fabricação de queijos denominada de corte, tem como objetivo produzir uma grande superfície livre para que se possa ocorrer a sinérese e facilitar a retração do coágulo. O tamanho dos grãos do coágulo após o corte depende da variedade de queijo que se deseja, quanto maior o grão, maior a umidade no produto final (FOX, 2000).

Na etapa da enformagem completa-se a sinérese e os queijos obtêm maior consistência e forma típica, conferindo ao produto as medidas e o peso requerido. Durante a enformagem os queijos são virados várias vezes para facilitar a saída do soro e a formação da casca. Alguns queijos são submetidos à prensagem, principalmente os queijos duros e semi-duros, que acelera a dessoragem e proporciona melhor consistência (ibid).

Existem maneiras distintas de salgar os queijos, como: salga no leite, na massa, a seco (na superfície do queijo) e em salmoura. A salga em salmoura é a maneira mais usual. A concentração da salmoura deve ficar entre 18-23% de NaCl e o pH ideal da salmoura deve estar entre 5,2 e 5,3 para temperaturas entre 10-14°C, de modo a facilitar a absorção do sal e manter um grau ótimo de dissolução da caseína (PERRY, 2004). O pH da salga é dependente do pH do queijo que está sendo fabricado (FURTADO, 1991).

Com poucas exceções, os queijos contêm entre 0,5-2,0% de NaCl. Durante a salga do queijo, a diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a massa faz com que parte da umidade seja liberada, arrastando consigo soroproteínas, ácido láctico e minerais dissolvidos, ao mesmo tempo em que o NaCl é absorvido. Para que este equilíbrio funcione bem é importante que a concentração da salmoura e o pH sejam apropriados. O teor de cálcio do meio deve ser da ordem de 0,1-0,2% podendo ser ajustado por adição de CaCl_2 , se necessário (PERRY, 2004).

Durante o processo de salga ocorre troca de íons Ca^{2+} por Na^+ nas moléculas de caseína, o que torna a massa mais macia. O conteúdo de sal também influi no sabor do queijo, na regulação do conteúdo de soro e da acidez, no desenvolvimento de certas bactérias patogênicas, inibindo-as, e evita contaminações (SCOTT et al., 1998).

A fabricação de queijos no Brasil é relativamente recente, firmando-se do ponto de vista industrial, a partir da década de 20, com o estabelecimento de

imigrantes dinamarqueses e holandeses em Minas Gerais. Desde então, cresceu muito a produção de queijos e as variedades disponíveis no mercado (FURTADO, 1991).

No Brasil, o consumo anual de queijos, em 2007, foi de 3,1 Kg *per capita*. Este valor vem crescendo ao longo dos anos, visto que no ano 2000 o consumo era de 2,6 Kg *per capita*, mas ainda é pequeno quando comparado ao consumo da Argentina ou dos Estados Unidos, com respectivamente 11,2 e 14,9 Kg *per capita* (EMBRAPA, 2010).

O queijo mais fabricado no Brasil, em 2004, foi o queijo Prato (incluindo as variedades Lanche, Cobocó, Gouda e Estepe, que possuem as mesmas raízes e são muito similares), em segundo lugar foi o queijo Mozzarella (muito utilizado em pizzarias e lanchonetes) e em terceiro lugar o queijo Minas Frescal (FURTADO, 1991; EMBRAPA, 2010).

Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 25 milhões de toneladas de leite, sendo que 34% do total de leite com fiscalização foi destinado à fabricação de queijos (Figura 1), perfazendo 580 mil toneladas. Os dados acima citados ilustram a importância social e econômica do produto para o país (EMBRAPA, 2010).

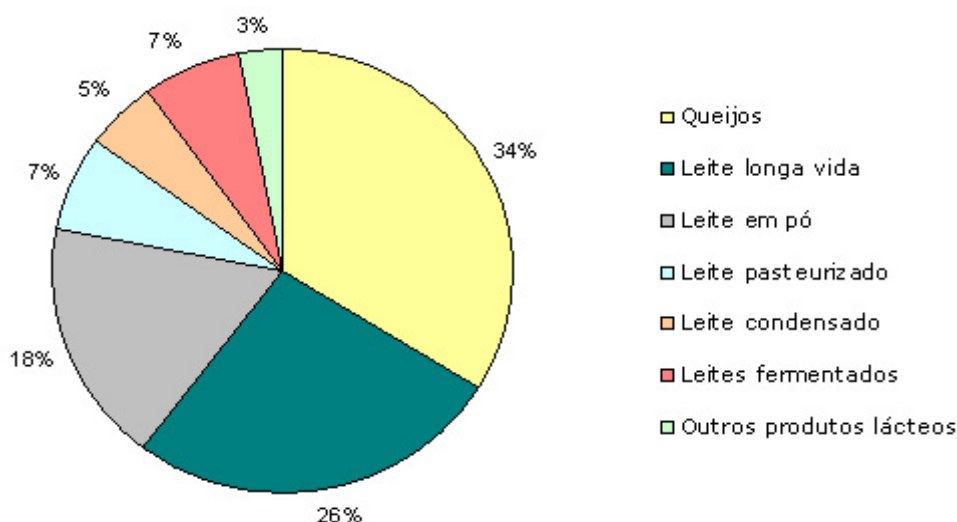


Figura 1: Representação gráfica das formas de industrialização do leite com SIF, no Brasil em 2007.

Fonte: EMBRAPA Gado de Leite, em 2010.

A indústria de queijos no Brasil está em expansão. Contudo, para se tornar mais lucrativa é preciso aumentar a produtividade e diminuir as perdas causadas por problemas na fabricação e defeitos nos queijos (FURTADO, 1991).

2.2 QUEIJO MINAS FRESCAL

Queijo Minas Frescal é o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

Este produto láteo possui consistência branda e macia, textura fechada com ou sem olhaduras mecânicas, cor esbranquiçada, sabor suave ou levemente ácido, odor suave característico, não possui crosta ou apresenta crosta fina, possui pouca acidez. Possui forma cilíndrica e peso de 0,3 a 5 kg, sendo comercializado geralmente em formas de menor peso (BRASIL, 1997; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). É classificado como um queijo semi-gordo (entre 25,0 e 44,9% de matéria gorda, no extrato seco), de muito alta umidade (umidade não inferior a 55,0%), a ser consumido fresco (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997).

A classificação dos queijos baseia-se em características como o teor de gordura, o teor de umidade, presença ou não de tratamento térmico durante a fabricação e tipo de maturação (BRASIL, 1996).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades da indústria de laticínios. Entre os tipos de maior consumo está o queijo Minas Frescal. Isso se deve ao bom rendimento que proporciona na fabricação (6,0 a 6,5 litros / Kg, em média). Além disso, requer um processamento simples e breve período necessário para a maturação do produto final, o que possibilita um retorno rápido do investimento e menores custos de produção por não necessitar de muitos investimentos em estocagem e conservação, o que possibilita a comercialização a preços mais acessíveis a uma maior faixa da população (FURTADO, 1991; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; PINTO et al., 2004).

Por possuir alto teor de umidade (55 a 58%), é um tipo de queijo bastante suscetível a alterações bioquímicas e microbiológicas, encurtando a validade comercial (durabilidade média de dez dias, dependendo do processo de fabricação), (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; PINTO et al., 2004). Ribeiro et al. (2009), considera 20 dias como validade comercial do queijo Minas Frescal.

O controle da acidez durante o período de validade é importante para a definição da qualidade do queijo Minas Frescal, a acidificação é um dos principais fatores que determinam a durabilidade, sendo que o desenvolvimento de acidez

excessiva causa alterações de sabor e de textura (desmineralização da massa) que limita a validade comercial do produto (VAN DENDER et al.,1999). A produção de ácido láctico a partir da decomposição da lactose, influencia o pH, o equilíbrio iônico e inibe o crescimento de alguns patógenos. Devido ao elevado teor de umidade e lactose do Minas Frescal, a produção de ácido é facilitada (LOURENÇO NETO, 1998).

Devido à adoção de diferentes métodos de fabricação (por exemplo, com adição de ácido láctico ou emprego de fermento, assim como variações na temperatura de coagulação ou até mesmo emprego de prensagem), tornou-se um tipo de queijo bastante irregular em termos de padrão de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento, chegando inclusive a ser fabricado por meio do processo de ultrafiltração (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Com a evolução das técnicas industriais, o processo de obtenção do Minas Frescal foi sendo alterado visando, de modo geral, maior rendimento de fabricação, maior qualidade e maior padronização no produto final (VAN DENDER et al.,1999).

2.3 CONTAMINAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL POR *E. coli*

Dentre os problemas relativos à qualidade do queijo Minas Frescal, os mais importantes são a alta contagem bacteriana e o estufamento precoce. Este é causado, principalmente, por microrganismos do grupo dos coliformes que fermentam a lactose produzindo ácidos, CO₂ e hidrogênio, formando um grande número de olhaduras, irregulares e pequenas, distribuídas em toda a massa, também podem ocorrer alterações de sabor e odor, má estrutura dos coágulos e limosidade nos queijos. Geralmente o defeito ocorre entre o processo de fabricação e o processo de salga, tornando-se perceptível no final da prensagem ou durante a salga em salmoura (FURTADO, 1991; FURTADO, 2005; PINTO et al., 2004; SPREER, 1991).

Dentre as bactérias do grupo coliformes, a *Escherichia coli* e a *Enterobacter aerogenes* são causadoras mais frequentes do estufamento precoce em queijos. A bactéria *E. aerogenes* produz mais gás carbônico do que a *E. coli*, portanto a presença de *E. aerogenes* no queijo é mais danosa (FURTADO, 1991).

O estufamento precoce de queijos produzidos com leite pasteurizado está relacionado à recontaminação após o tratamento térmico, uma vez que as bactérias do grupo coliformes são destruídas no processo de pasteurização (ibid).

A recontaminação do leite pasteurizado pode ocorrer por deficiência no processo de limpeza dos equipamentos e utensílios, falhas na pasteurização (como tempo e temperatura inadequados ou mistura de leite cru com pasteurizado) e falta de higiene dos operadores (CORTEZ; CORTEZ, 2008).

Em virtude da composição, os queijos constituem um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive os da espécie *E. coli*, que é predominante entre os diversos microrganismos anaeróbicos facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, e é membro da microbiota intestinal normal do homem (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Pertence à família *Enterobacteriaceae*, e entre as principais características da *E. coli*, destacam-se: são bacilos Gram-negativos, não esporulados, pertencentes ao grupo dos coliformes totais, capazes de fermentar a lactose, com produção de ácido e gás, quando incubadas a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (BRENNER, 1984).

A presença de *E. coli* em um alimento indica contaminação microbiana de origem fecal e a possibilidade da presença de outros microrganismos enteropatógenos, estando em condições higiênicas insatisfatórias. Embora também possa ser introduzida nos alimentos por fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento. Além disso, diversas linhagens dessa bactéria são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (BRENNER, 1984; FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA et al., 1997; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As cepas de *E. coli* implicadas nas enfermidades de origem alimentar podem ser incluídas em cinco grupos: enteropatógenas clássicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), e facultativamente enteropatógenas (FEEC) (JAY, 1994).

Diversos autores indicam que queijos Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados. Araújo et al. (1997)¹ apud Rocha et al. (2006) observaram que 100% das amostras analisadas, obtidas em supermercados e

¹ ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P. Análise bacteriológica do queijo-de-minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: SBM, 1997.

padarias localizadas na cidade do Rio de Janeiro, continham a presença de coliformes fecais em níveis acima dos tolerados.

Oliveira et al. (1998) relataram a detecção de coliformes totais e fecais acima dos permitidos, respectivamente, em 46,9% e 9,4% das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo.

Pereira et al. (1999) observaram que 90% das amostras do Minas Frescal, comercializadas em Belo Horizonte, apresentaram coliformes fecais acima dos limites estabelecidos por lei.

Com o objetivo de avaliar as condições microbiológicas do Minas Frescal, Pinto et al. (2004) analisaram quatro marcas diferentes, com três repetições, na região de Feira de Santana, Bahia. Verificaram que 42% das amostras estavam com os níveis de coliformes fecais acima do permitido, quanto aos coliformes totais, 100% das amostras estavam com os níveis acima do permitido.

Rocha et al. (2006) avaliaram a contaminação de sete marcas do queijo Minas Frescal, comercializadas em São Paulo, e constataram que seis marcas se apresentavam impróprias para o consumo no sétimo dia de fabricação, sendo o prazo comercial estimado pelos fabricantes de 21 a 30 dias. Constataram também que 61% apresentaram contagens de *E. coli* acima do limite estabelecido pela legislação, onde consta ser de no máximo 5×10^2 UFC/g (BRASIL, 2001).

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os laticínios, pela própria matéria-prima que utilizam e pelo alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente suscetíveis à contaminação. Por isso, a importância da conscientização dos profissionais do setor, em todos os níveis, para a necessidade da implantação de programas de boas práticas de fabricação e do controle permanente dos processos e seus pontos críticos (PERRY, 2004).

2.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

São considerados alimentos funcionais os que além de fornecerem a nutrição básica, promovem efeitos benéficos à saúde. Esses alimentos possuem potencial

para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (BRASIL, 1999; SANDERS; O'SULLIVAN, 2003; SHORTT; O'BRIEN, 2004).

A microbiota intestinal humana exerce um papel fundamental no desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, contribuindo para a saúde. A suplementação da dieta com probióticos e prebióticos pode assegurar o equilíbrio da microbiota entérica. Os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que 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. A inulina e a oligofrutose destacam-se entre os prebióticos mais estudados (ARAÚJO et al., 2009; BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006).

O efeito dos microrganismos probióticos e dos ingredientes prebióticos pode ser potencializado, através da associação, dando origem aos alimentos funcionais simbióticos (BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006).

2.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS PROBIÓTICOS

Inicialmente, os probióticos foram definidos como organismos ou substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Mais tarde, surgiram outras definições, sendo a de Fuller a mais conhecida, segundo a qual os probióticos são suplementos alimentares microbianos vivos que apresentam efeitos benéficos para o hospedeiro, promovendo o equilíbrio microbiano intestinal. Produtos com microrganismos probióticos são extensivamente usados na criação de animais e são comercializados em diversas formulações para o consumo humano, sendo o mais comum o leite fermentado (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Segundo a RDC número 02, de 07 de janeiro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002b). Segundo a ANVISA (2008), são considerados

probióticos os seguintes microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhannosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*.

A quantidade mínima viável para os microrganismos probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a eficácia (ANVISA, 2008). Para leites fermentados, na Instrução Normativa número 47 consta que a quantidade mínima deve ser de 10^6 a 10^7 UFC de microrganismos probióticos, por grama do produto (BRASIL, 2007).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, apresentam um grande interesse do ponto de vista industrial, pois estão envolvidas no desenvolvimento de uma classe de produtos com um grande potencial de mercado, na indústria de alimentos nacional e internacional. Isso devido ao seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, uma vez que são isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006).

As propriedades físico-químicas dos produtos láteos, como a capacidade tamponante e o pH, influenciam a sobrevivência de estirpes probióticas, durante o trânsito intestinal. Há, também, outros fatores que, possivelmente, poderiam estar envolvidos na sobrevivência do probiótico, como polissacarídeos extracelulares, teor de gordura e a matriz densa de queijos (GARDINER et al., 1998).

A sobrevivência das bactérias probióticas em queijos frescos é maior quando comparadas a queijos maturados. A maior sobrevivência está relacionada ao menor tempo de armazenamento, ao menor teor de sal e a maior umidade e água de atividade dos queijos frescos, que não limitam a multiplicação dos microrganismos probióticos (CICHOSKI et al., 2008).

As influências benéficas das culturas probióticas à saúde humana, que mais se destacam são: modulação e controle da microbiota intestinal (devido à competição por nutrientes, por sítios de adesão e produção de compostos antimicrobianos), alteração do metabolismo microbiano (por aumento ou diminuição da atividade enzimática), estímulo à imunidade do hospedeiro (por aumento dos

níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos), estabilização da microbiota intestinal após o uso de antimicrobianos, estímulo da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos (através da produção de peróxido de hidrogênio, ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos), melhora da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, como o cálcio, e produção de vitaminas (SAAD, 2006; SANDERS; O'SULLIVAN, 2003; SHORTT; O'BRIEN, 2004).

Diversos produtos láteos foram testados como veículo para adição de microrganismos probióticos, apresentando-se como excelente fonte de incorporação, por manter contagem elevada dos probióticos, durante todo o período de validade. Entre os produtos testados, pode-se citar: o sorvete (ANDRADE et al., 2004), diversos tipos de queijos (ARAÚJO et al., 2009; BARRETO et al., 2003; CICHOSKI et al., 2008; GARDINER et al., 1998), iogurte e bebidas lácteas (GOMES et al., 2004) .

2.6 *Lactobacillus acidophilus*

Entre os microrganismos possíveis de estar presentes nos diversos tipos de queijos, encontram-se as Bactérias Ácido-Láticas (BAL). O grupo das BAL compreende oito gêneros de bactérias Gram positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*. Existem várias substâncias antimicrobianas que podem ser produzidas por Bactérias Ácido-Láticas. Entre as quais são citadas: ácidos orgânicos (como ácido lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (GUEDES NETO et al., 2005; JAY, 1994; NES et al., 1996).

As bacteriocinas são definidas como substâncias produzidas por bactérias que são capazes, em baixas concentrações, de inibir a multiplicação de outras bactérias taxonomicamente afins (RILEY, 1998). Ou, também podem ser definidas como proteínas antimicrobianas, ribossomicamente sintetizadas e secretadas por bactérias. Podem apresentar efeito bactericida ou bacteriostático, dependendo da

concentração, contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor (FOX, 2000).

A produção de ácido láctico e acético pelas bactérias probióticas reduz o pH do ambiente gastrointestinal, prevenindo o crescimento de vários agentes patogênicos e permitindo o desenvolvimento de certas espécies de *Lactobacillus* (GARCIA et al., 2006).

Os *Lactobacillus* spp. são bacilos Gram-positivos, retos ou curvos, ocorrendo isolados ou em cadeias, não esporulados, mesofílicos e acidúricos (com pH ótimo entre 5,5 e 6,2). Geralmente são imóveis e catalase negativos. Tem necessidade de nutrientes complexos, sendo o crescimento facilitado pela presença de CO₂. São bactérias que fermentam carboidratos produzindo ácido láctico, podendo ser homo ou heterofermentativos. Devido a essa propriedade, os *Lactobacillus* spp. podem ser muito úteis na produção de alimentos, mas podem causar também deterioração, porém, são muito pouco proteolíticos e lipolíticos. Normalmente não são patogênicos (HOLT et al., 1994; KANDLER; WEISS, 1984).

Os *Lactobacillus* spp. isolados de alimentos são microaerófilos existindo, no entanto, estirpes anaeróbicas, encontradas principalmente em fezes humanas e rúmen. São amplamente distribuídas no meio ambiente, especialmente em alimentos, vegetais e animais, e em laticínios (HOLT et al., 1994; JAY, 1994).

O gênero *Lactobacillus* apresenta espécies homoláticas e heteroláticas. Os heterofermentadores são mais importantes que os homofermentadores, por produzirem substâncias responsáveis pelo aroma e sabor, tais como o acetaldeído e o diacetil (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 1994).

Os *Lactobacillus* spp. podem ser subdivididos em três subgêneros: *Betabacterium*, *Streptobacterium* e *Thermobacterium*. Com temperatura ótima de crescimento de 30°C, os *Streptobacterium* (por exemplo, *L. casei* e *L. plantarum*) produzem até 1,5% de ácido láctico, enquanto que as *Thermobacterium* (por exemplo, *L. acidophilus* e *L. bulgaricus*) produzem até 3,0% de ácido láctico e tem temperatura ótima de crescimento de 40°C (JAY, 1994).

Diversos pesquisadores relatam que *L. acidophilus* é o microrganismo mais indicado na utilização como probiótico, quando comparado a outras espécies de *Lactobacillus* spp., por possuir capacidade de se aderir ao epitélio intestinal e, também, por ser capaz de tolerar a acidez do suco gástrico. *L. acidophilus* é um bacilo Gram-positivo com extremidades arredondadas, que se encontra na forma de

células livres, aos pares ou em cadeias curtas, com tamanho típico de 0,6-0,9 µm de diâmetro e 1,5-6,0 µm de comprimento, produz bacteriocina com atividade de amplo espectro (GARCIA et al., 2006; KANDLER; WEISS, 1984).

Diversos tipos de queijos são adequados como veículos para a incorporação de bactérias probióticas. O microrganismo probiótico *L. acidophilus* foi testado em diversos queijos com resultados favoráveis (BURITI et al., 2005; CHIODA et al., 2006; CHIODA et al., 2007; GARDINER et al., 1998; GUEDES NETO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009; SOUZA, 2006).

2.7 ACIDIFICAÇÃO DIRETA DO QUEIJO MINAS FRESCAL

A acidificação adequada dos queijos é uma das formas de melhorar as características de produção e de preservação, diminuindo as alterações das propriedades de qualidade do produto ao longo do tempo de estocagem (FOX, 2000). Provavelmente, muitos estabelecimentos industriais fabricam o queijo Minas Frescal com o uso de ácido láctico (LOURENÇO NETO, 1998).

A utilização de ácido láctico, como agente regulador de acidez (BRASIL, 1996), afeta vários aspectos dos queijos maturados, como: melhora a atividade coagulante, ficando mais firme e resistente, o que melhora o rendimento dos queijos e influencia negativamente o crescimento das bactérias, pois apresentam potencial na inibição de diversos microrganismos, inclusive as patogênicas (FOX, 2000). Além disso, diminui a proteólise dos queijos, que causa o amolecimento e amarelamento da casca com formação de sabor e aroma mais pronunciado, e obtêm-se produtos com menores alterações durante a comercialização (LOURENÇO NETO, 1998).

Do ponto de vista físico-químico, os queijos produzidos com o uso de fermento láctico mesofílico e microrganismos probióticos proporcionam a obtenção de queijos com composição similar aos obtidos com uso exclusivo de ácido láctico. Porém, a adição do fermento láctico e dos probióticos confere aos produtos maior tendência de inibição de microrganismos contaminantes, em relação ao uso exclusivo de ácido láctico (LOURENÇO NETO, 1998).

Devido ao alegado aumento de rendimento de fabricação dos queijos, grande parte das fábricas vem substituindo o uso de fermento láctico por ácido láctico na

fabricação do Minas Frescal. Campos e Viotto (1999) estudando o rendimento do queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico e diferentes concentrações de fermento láctico estabeleceram que o aumento do rendimento de fabricação atribuído ao ácido láctico, se deve menor acidificação dos queijos e consequente aumento da capacidade de retenção de água. Entretanto, com o uso do ácido láctico, os queijos deixam de ter a proteção contra os microrganismos contaminantes conferido pelas bactérias do fermento.

2.8 ADIÇÃO DE *L. acidophilus* E ÁCIDO LÁCTICO EM QUEIJOS

A adição de probióticos em queijos e a acidificação direta, utilizando ácido láctico, foram estudadas, em diversos experimentos, com a finalidade de verificar melhorias na qualidade bacteriológica, físico-química e sensorial dos queijos.

Lourenço Neto (1998), estudou alternativas para melhorar a qualidade do Minas Frescal, e concluiu que o emprego de culturas termofílicas compostas de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* proporcionam queijos com composição similar aos queijos produzidos com ácido láctico. Porém, o queijo com a adição das bactérias probióticas apresenta maior controle da microbiota contaminante do queijo.

Van Dender et al. (1999) estudaram o queijo Minas Frescal fabricado com retentados obtidos pela ultrafiltração, adicionado de ácido láctico e na fabricação tradicional e verificaram aumento na acidez titulável do produto com ácido láctico.

As bactérias lácticas, como os *Lactobacillus* spp., são empregadas em alimentos por séculos, especialmente no leite e em produtos de carne. Além da atividade antimicrobiana do ácido láctico, peróxido de hidrogênio e diacetil, os *Lactobacillus* spp. também produzem bacteriocinas, as quais inibem o crescimento de patógenos e deteriorantes alimentares, aumentando a segurança microbiológica e o tempo de validade comercial do produto (ROSA; FRANCO, 2002). O processamento de alimentos funcionais contendo bactérias probióticas, principalmente a incorporação em leites fermentados e queijos, vem resultando em

produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a viabilidade e a funcionalidade são mantidas (OLIVEIRA et al., 2002).

Avaliando as implicações da incorporação no queijo Minas Frescal de *L. acidophilus* e ácido láctico e comparando-o com o tradicional, Buriti et al. (2005) constataram que não ocorreu diferença significativa no rendimento, umidade, gordura e proteína nos queijos quando comparados ao tradicional. O queijo contendo o probiótico foi o mais preferido pelos consumidores. Na contagem de *L. acidophilus* durante a armazenagem constataram que não ocorreu diferença significativa na contagem, a bactéria probiótica se manteve viável e em níveis constantes durante toda a armazenagem.

Guedes Neto et al. (2005) testaram as atividades antagonistas *in vitro* das BAL isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial frente aos microrganismos indesejáveis. Foram utilizadas, entre outras bactérias, quatro espécies de *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*). Constataram que os *Lactobacillus* spp. testados foram capazes de inibir as cepas de *Staphylococcus* spp. e *E. coli* isoladas das mesmas amostras de queijo. E, entre as espécies de BAL testadas, *Lactobacillus* spp. apresentou a melhor perspectiva de utilização na fabricação do queijo, visando melhorar a qualidade sanitária, pois apresentou melhor atividade antagonista frente a microrganismos patogênicos de relevância nesse alimento.

Garcia et al. (2006) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de nove isolados de *L. acidophilus*, através da produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos produzidos por *L. acidophilus*, sobre bactérias patogênicas. A maioria apresentou fortes halos de inibição, ou seja, atividade inibitória contra as bactérias testadas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Clostridium perfringens*).

Souza (2006) estudou a evolução das bactérias *Staphylococcus* spp., e coliformes totais em queijo Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus* e no queijo Minas Frescal com fabricação tradicional. O queijo tradicional apresentou aumento constante de *Staphylococcus* spp., ao longo da armazenagem, o que não foi detectado no produto com probiótico, onde ocorreu inibição deste contaminante, possivelmente pela ação de bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Quanto aos níveis de coliformes totais o probiótico adicionado não inibiu a multiplicação, porém, o queijo permaneceu dentro dos padrões da legislação. Também foi verificado que a adição de *L. acidophilus* resultou em benefícios

sensoriais aos produtos, além disso, resultou em um produto essencialmente funcional, com características microbiológicas, físico-químicas e de textura adequadas e superiores aos queijos produzidos somente com acidificação direta do leite com ácido láctico.

Chioda et al. (2006) analisaram a capacidade inibitória de *L. acidophilus* sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em queijo Minas Frescal, na concentração de 10^6 UFC/mL, e concluíram que o microrganismo probiótico *L. acidophilus* C1 mostrou-se eficiente na eliminação de *L. monocytogenes*. Enquanto que os tratamentos realizados com adição de ácido láctico provaram não serem eficazes na eliminação do microrganismo patogênico estudado, contribuindo para o seu aumento.

Sangaletti (2007) estudou o prazo comercial do queijo Minas Frescal disponível nos supermercados, através de análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais e concluiu que as bactérias mesofílicas, psicrotróficas totais, psicrotróficas proteolíticas, psicrotróficas lipolíticas e lácticas tiveram crescimento constante no queijo durante o armazenamento. Mesmo sob refrigeração, a acidez aumentou ao longo do tempo, porém, o queijo não apresentou alterações sensoriais.

Em estudo realizado por Chioda et al. (2007), visando avaliar o grau de atividade antagonista de cinco estirpes de *L. acidophilus* (P1, P3, P4, P6, P12), com capacidade inibitória sobre *E. coli*, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando o teste de inibição, pelo método de dupla camada, para avaliar zonas de inibição de crescimento e houve constatação que todas as estirpes foram eficientes no controle da *E. coli*, pois mostraram fortes zonas de inibição variando de 12 a 15mm de diâmetro.

Cichoski et al. (2008) analisaram o efeito da adição do probiótico *L. rhamnosus* sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura e fabricado com fibras e lactato de potássio e concluíram que no queijo com adição de cultura probiótica ocorreu melhor desenvolvimento das bactérias ácido lácticas, maiores valores de pH e lactose, e baixa acidez.

RIBEIRO et al. (2009) desenvolveram uma formulação para a produção de queijo Minas Frescal probiótico, a partir de retentados de ultrafiltração, estudaram a sobrevivência da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus*, adicionada em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/g), durante o prazo comercial e avaliaram as alterações físico-químicas e sensoriais. Verificaram que o decréscimo da população de *L. acidophilus* não foi significativo para os queijos, a variação da

concentração do inóculo de *L. acidophilus* não alterou as características físico-químicas e sensoriais do produto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA PRIMA E INGREDIENTES

A produção do queijo Minas Frescal foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, pertencente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Os queijos foram elaborados com leite previamente pasteurizado, sendo utilizadas quantidades de cloreto de cálcio (marca Cap-Lab), coagulante microbiano comercial (marca CHR Hansen, produzida por cepa de *Aspergillus niger var. awamori*) e cloreto de sódio (refinado extra iodado, marca Cisne), segundo o preconizado por Furtado e Lourenço Neto (1994). Para o primeiro processamento, o leite foi obtido em uma fazenda no município de Mirai/RJ, sendo imediatamente transportado sob refrigeração e pasteurizado ao chegar a Faculdade de Veterinária da UFF (pasteurização lenta). Na segunda elaboração, o leite, já pasteurizado, foi obtido no comércio local.

O leite utilizado na produção dos queijos foi analisado quanto à presença de resíduos de antimicrobianos, antes de cada produção, através do teste Eclipse. Somente foi utilizado leite sem a presença de resíduos de antibióticos.

3.2 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVOS

A cultura de *E. coli*, utilizada no experimento, foi do tipo enteropatogênica, proveniente da Fiocruz (lote 0499184, origem CDC 0126), e sendo mantida sob congelamento a -18°C até o momento da utilização.

Para ativação, a cultura foi descongelada à temperatura ambiente por duas horas e repicada para o caldo "Brain Heart Infusion" (BHI) (MERCK, 13825). Foi incubada a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ por 18 a 20 horas, para obter o máximo de potencial imunogênico e patogênico do microrganismo. Após esse tempo foi verificada a presença de sedimento no fundo do tubo e turvação, que caracteriza o crescimento do microrganismo no meio.

A concentração desejada de *E. coli*, para inoculação no leite, de 10^8 , foi obtida utilizando-se a escala de Mac Farland (CHIODA et al., 2006). Do caldo BHI, quantidades da cultura foram transferidas para a Solução Salina Peptonada a 0,1% (SSP 0,1%) (MERCK, 7228), até a obtenção de turvação compatível com a turvação da escala Mac Farland.

Para a produção do queijo Minas Frescal Probiótico, foi utilizada a cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, fornecida pela Chr. Hansen), mantida em congelamento a -18°C até o momento de uso. A concentração para a inoculação no leite foi de 10^8 UFC/mL. Conforme indicação do fabricante, a cultura foi adicionada diretamente no leite, na quantidade indicada (um envelope de 25g para cada 500L de leite).

3.3 ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS

A fabricação do queijo seguiu o procedimento indicado por Furtado e Lourenço Neto (1994), foram utilizados 12 L de leite pasteurizado, por tratamento, cloreto de cálcio solução a 40% (marca Cap-Lab) e coagulante (marca CHR Hansen, produzida por cepa de *Aspergillus niger var. awamori*).

Foram realizadas seis produções distintas, esquematizadas na Tabela 1.

Tabela 1-Diferentes tratamentos utilizados na produção do queijo Minas Frescal, no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

Tratamentos		Adições	
T1	-	-	-
T2	<i>L.acidophilus</i>	-	-
T3	-	Ácido láctico	-
T4	<i>L.acidophilus</i>	-	<i>E. coli</i>
T5	-	Ácido láctico	<i>E. coli</i>
T6	-	-	<i>E. coli</i>

- = Sem Adições

O leite pasteurizado resfriado foi aquecido a 35 - 37°C, adicionado da solução de cloreto de cálcio e homogeneizado. Em seguida, foi adicionada a cultura de *E. coli*, na concentração de 10^8 , pela escala Mac Farland, nos tratamentos T4, T5 e T6.

Ocorreu a adição da cultura de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, Chr. Hansen), previamente diluída em 25 mL de água destilada na concentração de 10^8 UFC/mL, nos tratamentos T2 e T4. Para a acidificação direta do leite, nos tratamentos T3 e T5, foram adicionados 2,5 mL de ácido láctico para cada 10 L de leite, previamente diluído em 25 mL de água destilada. Após cada adição, o leite foi homogeneizado e como último ingrediente, adicionou-se o coagulante.

Em seguida, a massa permaneceu em repouso por 30 a 40 minutos, para que ocorresse a coagulação. Após esse tempo, foi realizado o corte, de forma lenta, para a obtenção de cubos grandes (grão número um, com 1,5 a 2,0 cm de aresta) e foi deixado em repouso por três minutos. Depois, realizou-se a mexedura da massa por 20 minutos (Figura 2), de forma lenta e suave, o que proporcionou a retração do coágulo e a expulsão parcial do soro, com a obtenção de grãos ligeiramente mais firmes e mais arredondados.



Figura 2- Mexedura da massa do queijo Minas Frescal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

A massa do queijo foi transferida para formas de 400 gramas, sendo preenchida até a metade da forma para a obtenção final de aproximadamente 200

gramas de queijo (Figura 3). Após 30 minutos foi realizada a primeira viragem. Durante o período de quatro horas, as formas foram viradas com intervalos de uma hora. Em seguida, os queijos foram retirados da forma e salgados por salmoura a 20% de cloreto de sódio, por 60 minutos (Figura 4). Após a salga, foram acondicionados em embalagens plásticas e armazenados sob refrigeração a 4° C até a realização das análises.



Figura 3- Enformagem do queijo Minas Frescal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.



Figura 4- Salga do queijo Minas Frescal, em salmoura a 20% de sal, realizada no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

O fluxograma para a fabricação do queijo Minas Frescal consta a seguir, na Figura 5:

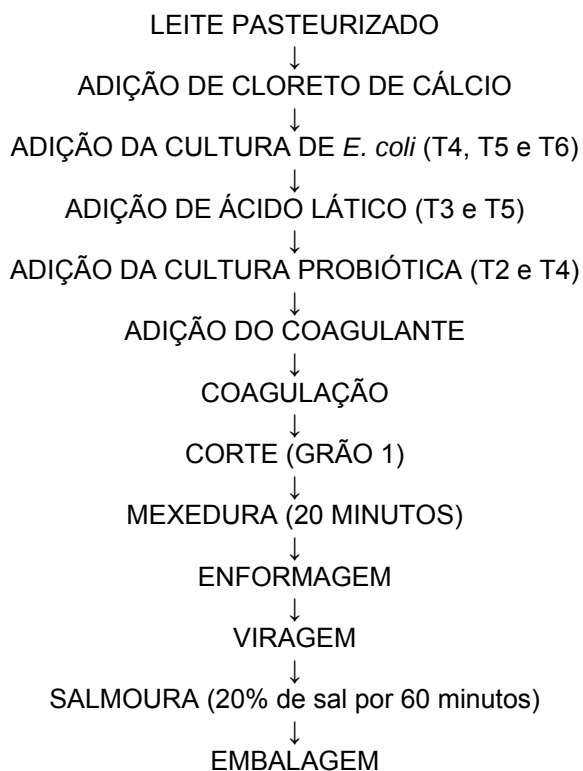


Figura 5- Fluxograma de elaboração do queijo Minas Frescal, produzido no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FABRICAÇÃO

As análises Físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal e no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, pertencentes ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

O leite empregado na fabricação dos queijos foi caracterizado por composição (teor de lactose, proteínas, sais, gordura e sólidos não gordurosos), densidade e crioscopia. Durante a acidificação do leite foram procedidas as análises de acidez titulável e pH. Estas análises, durante a fabricação foram realizadas imediatamente após as seguintes ações: aquecimento do leite, adição dos ingredientes, corte, mexedura, enformagem, primeira viragem, fim da viragem, salga, e embalagem. Os resultados foram avaliados por análise estatística descritiva simples.

3.4.1 Composição, densidade e crioscopia do leite

Para avaliar a qualidade físico-química do leite empregado na elaboração dos queijos, foram efetuadas as análises de composição, densidade e crioscopia, em duplicata. Para a análise de composição (teor de lactose, proteínas, sais, gordura e sólidos não gordurosos) do leite, foi utilizado o método de análise por ultra-som, pelo multianalisador de leite Boecolac 70 (BOECO Ltda).

As análises de índice crioscópico e densidade relativa a 15°C foram realizadas conforme a metodologia oficial (BRASIL, 2006).

3.4.2 Acidez titulável

A acidez titulável do leite foi efetuada conforme a metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006), que tem como princípio a titulação de determinado volume de leite por uma solução

alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína. O procedimento consiste em transferir 10 mL da amostra para o béquer e adicionar quatro a cinco gotas da solução de fenolftaleína a 1% e titular com solução Dornic (hidróxido de sódio 0,111 N), até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Obtém-se o resultado através do volume gasto de solução Dornic. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para a realização da determinação de acidez na massa e no queijo, foi empregado o método preconizado pela Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (ibid), que tem como princípio a extração dos ácidos graxos livres solúveis com água a 40°C e posterior neutralização até o ponto de equivalência, com solução alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína. Utiliza como reagentes a solução alcoólica de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) a 1% (m/v) e a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,111 N (solução Dornic).

O procedimento consiste em transferir 10 g da amostra para um béquer de 150 mL, acrescentar cerca de 50 mL de água morna isenta de gás carbônico (40°C) e agitar com bastão de vidro até dissolução possível. Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, esfriar em água corrente e completar o volume. Transferir uma alíquota de 50 mL para um béquer de 150 mL, acrescentar dez gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% e titular com solução de hidróxido de sódio, até leve coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

Para obter o resultado utiliza-se o cálculo a seguir:

$$\% \text{ em ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Onde:

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

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

0,9 = fator de conversão do ácido láctico;

m = massa da amostra na alíquota, em gramas.

3.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

A realização da análise de pH seguiu a metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

A análise fundamenta-se na medida da concentração de íons hidrogênio na amostra. Os reagentes utilizados são: solução tampão pH 4,0 e solução tampão pH 7,0. Foi utilizado o potenciômetro digital (PHmeter Hanna, HI 221, SP Labor)

O procedimento consiste em calibrar o peagômetro com as soluções tampões pH 4,0 e 7,0 e medir o pH da amostra preparada. Para a análise do leite coloca-se 50 mL de amostra em um béquer de 100 mL. O preparo da amostra de queijo consiste em adicionar cerca de 20 mL de água destilada em um béquer de 50 mL. Acrescentar quantidades suficientes de amostra, homogeneizando com bastão de vidro de modo a obter uma pasta uniforme, colocar os eletrodos em contato com a amostra, aguardar a estabilização e fazer a leitura. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO

Para realizar a caracterização do produto, foi procedida uma análise físico-química por tratamento, em duplicata, no primeiro dia após a produção. As análises foram: composição (determinação de gordura, proteína, cloretos, umidade e cinzas), acidez titulável e pH. A avaliação dos resultados foi realizada por análise estatística descritiva simples.

3.5.1 Composição

Para a realização da composição foram realizadas as seguintes análises: Determinação de gordura, proteína, cloretos, umidade e cinzas.

3.5.1.1 Determinação de gordura

A análise de determinação do teor de gordura foi efetuada pelo Método Butirométrico para queijo, no butirômetro de leite, segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

A análise baseia-se no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico, que modifica a tensão superficial (ibid).

O procedimento consiste em pesar exatamente cerca de 1,0 a 2,0 g da amostra homogeneizada em béquer de 50 mL. Adicionar 10 mL da solução de ácido sulfúrico e aquecer a 60°C. Homogeneizar com bastão até dissolução completa do resíduo. Passar cuidadosamente para o butirômetro lavando duas vezes o béquer com 4,0 mL da solução de ácido sulfúrico. Adicionar ao butirômetro 1,0 mL de álcool isoamílico. Enxugar a boca do butirômetro, colocar a rolha apropriada, agitar e transferir para banho-maria a 65°C durante 10 minutos. Centrifugar durante cinco minutos. Recolocar no banho-maria por mais 10 minutos e fazer a leitura. Para a obtenção dos resultados utiliza-se o cálculo a seguir:

$$\% \text{ de Lipídios} = \frac{L \times 11,33}{m}$$

Onde:

L = leitura no butirômetro;

m = massa da amostra, em gramas.

3.5.1.2 Determinação de proteína

Para a realização da análise de determinação de proteínas foi utilizado o método Kjeldahl (BRASIL, 2006). A análise baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada. Podem-se expressar os resultados em proteínas, multiplicando-se a

porcentagem do nitrogênio total por fator específico, que no caso das proteínas do leite é 6,38.

Na utilização do aparelho micro-Kjeldahl, o procedimento consiste em pesar em balança analítica 0,25 g da amostra, embrulhar em papel livre de nitrogênio e transferir para tubo de Kjeldahl. Adicionar 0,25 g de mistura catalítica e 8,0 mL de ácido sulfúrico. Aquecer em bloco digestor por meia hora a 150°C; uma hora a 200°C; uma hora a 300°C e uma hora e meia a 400°C.

Quando o líquido se torna límpido e transparente, de tonalidade azul esverdeada, retira-se do aquecimento, deixar esfriar e adicionar 10 mL de água.

Para realizar a destilação, deve-se acoplar ao destilador um Erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% com oito gotas de solução de indicador misto (Erlenmeyer receptor do destilado).

Colocar o líquido do tubo Kjeldahl em um balão e completar com água destilada até 50 mL. Levar para a geladeira até esfriar. Colocar 10 mL da amostra no destilador e adicionar 7,0 mL de solução de hidróxido de sódio a 50%. Proceder à destilação coletando cerca de 100 mL do destilado. A solução receptora deve ser mantida fria durante a destilação.

A titulação foi realizada com solução de ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador. Para obter o resultado, o seguinte cálculo deve ser realizado:

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{m}$$

$$\% \text{ protídios} = \% \text{ nitrogênio total} \times f$$

Onde:

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

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

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

m = massa da amostra, em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína.

3.5.1.3 Determinação de cloretos

Para a realização da análise de determinação de cloretos foi utilizado o método de Mohr (BRASIL, 1981), que baseia-se na precipitação dos cloretos sob a forma de cloreto de prata, em pH levemente alcalino e em presença do cromato de potássio como indicador. No final da titulação visualiza-se a formação do precipitado vermelho tijolo de cromato de prata.

A técnica consiste em pesar 2,0 a 5,0 g da amostra, colocar a massa em cadinho de porcelana para carbonização em bico de Bunsen, e posteriormente em forno mufla a 550°C para incineração.

Objetivando facilitar a dissolução das cinzas, adiciona-se ao conteúdo do cadinho duas a três gotas de solução de Ácido Nítrico a 10% e 10 mL de água destilada quente. Agita-se com bastão de vidro o conteúdo do cadinho e filtra-se em papel de filtro para Erlenmeyer de 250 mL. O cadinho e o filtro de papel foram lavados com água destilada aquecida e a água proveniente desta lavagem foi adicionada ao conteúdo do Erlenmeyer. Mensura-se pH do filtrado, corrigindo-o para 8,0, quando necessário, com solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Adiciona-se à solução filtrada 1,0 mL da solução de Cromato de Potássio (K_2CrO_4) a 5% e titula-se com solução de Nitrato de Prata ($AgNO_3$) 0,1N até o aparecimento da coloração vermelho tijolo.

O cálculo do percentual de cloretos foi feito com a utilização das variáveis V (volume de $AgNO_3$ 0,1N gasto na titulação), P (peso inicial da amostra), fator de correção (f) e a normalidade (N) da solução de $AgNO_3$ 0,1N, na fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ Cloretos} = \frac{V \times f \times N \times 0,0585 \times 100}{P}$$

3.5.1.4 Determinação do teor de umidade

A determinação umidade foi procedida segundo o Método de Secagem pela Estufa a 105°C (BRASIL, 2005). É uma análise gravimétrica quantitativa, que se

fundamenta na perda de umidade e substâncias voláteis, quando submetida a aquecimento (105°C).

O procedimento consiste em colocar uma cápsula em estufa a 105°C durante uma hora para secar. Esfriar em dessecador e pesar a cápsula. A amostra (cinco gramas) foi pesada na cápsula, e levada para a estufa por três horas. Após esse tempo a amostra foi esfriada em dessecador, e pesada. Repete-se o procedimento até o peso constante. Consegue-se o peso constante quando a diferença entre as pesagens sucessivas é menor ou igual a 0,0005 gramas para cada grama de amostra ou quando a última pesagem for maior que a anterior, sendo a pesagem anterior considerada como o peso constante. Para obter o resultado, utiliza-se a fórmula a seguir:

$$\% \text{ umidade a } 105^{\circ}\text{C} = \frac{100 \times p}{p'}$$

p = perda de peso em g (p' - (peso constante – peso da cápsula) + alimento)

p' = peso inicial da amostra em g

3.5.1.5 Determinação do teor de cinzas

A análise de determinação do teor de cinzas foi realizada segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica a temperatura de 550°C. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo (ibid).

O procedimento consiste em aquecer o cadinho de porcelana em forno mufla a 550°C, durante 30 minutos, esfriar em dessecador e tarar. Pesar em balança analítica cinco gramas da amostra homogeneizada, diretamente no cadinho. Levar o conjunto ao bico de Bunsen até a carbonização completa e a seguir ao forno mufla no máximo a 550°C, para evitar perda de cloretos. Incinerar por três horas ou até obter cinzas totalmente brancas. Esfriar em dessecador e pesar. Não havendo clareamento das cinzas, adicionam-se duas a três gotas de água destilada e leva-se ao forno mufla por tempo suficiente para clareamento das cinzas. Esfriar em dessecador e pesar.

3.6 ANÁLISES DURANTE A ARMAZENAGEM

3.6.1 Análises físico-químicas

Para realizar o acompanhamento do produto e verificar as alterações na acidificação dos queijos durante o armazenamento, por 30 dias, foram realizadas as análises de acidez titulável e pH durante a estocagem (duplicatas), em sete momentos (nos dias 1°, 3°, 6°, 12°, 18°, 24° e 30°) após a fabricação. Os resultados foram avaliados por análise estatística descritiva simples.

3.6.2 Análises bacteriológicas

As análises bacteriológicas foram efetuadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

3.6.2.1 Número Mais Provável de *Escherichia coli*

No queijo Minas Frescal foi procedida à pesquisa do NMP de *E. coli*, em sete momentos (nos dias 1°, 3°, 6°, 12°, 18°, 24° e 30°) após a fabricação, em cada uma das produções. A técnica utilizada foi a de Miniaturização com o caldo Fluorocult (MERCK, 1996, modificado por FRANCO; MANTILLA, 2004).

As amostras possuíam a quantidade mínima de 200 g, conforme o estabelecido na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Durante o tempo de armazenagem, as amostras foram mantidas em refrigeração a 4°C.

Das amostras, de cada tratamento, pesava-se assepticamente uma alíquota de 25 g em uma balança analítica. A alíquota foi colocada em saco plástico estéril, diluída e homogeneizada com pequena quantidade de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% (MERCK, 7228) em “Stomacher” (Laboratory Blender, Stomacher 80), velocidade média por dois minutos. Depois da homogeneização, o restante da SSP foi transferido totalizando 225 mL, formando a diluição 10^{-1} e, em seguida, as diluições seriadas consecutivas.

A Técnica de Miniaturização consiste em utilizar microtubos “Eppendorfs” contendo 900 μ L de caldo Fluorocult (MERCK, 10620), em triplicata, e alíquotas de 100 μ L de cada uma das diluições das amostras. A incubação é feita a 35 - 37°C por 24 – 48 h.

O caldo Fluorocult é um caldo de enriquecimento seletivo para a identificação simultânea de coliformes totais e *E. coli* em águas e alimentos. O que é possível pela presença do substrato cromogênico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-Galactopiranoside (X-GAL) que é metabolizado pelos coliformes levando a viragem da cor do meio, que se torna esverdeado. Também há o substrato fluorogênico 4-Metilumbeliferil- β -D-Glucoronídeo (MUG), altamente específico para *E. coli* (MERCK, 1996).

A positividade para *E. coli* no caldo Fluorocult foi verificada pela viragem da coloração, de amarelado para esverdeado. Os “Eppendorfs” esverdeados foram colocados contra a luz ultravioleta (366 nm), e os que apresentavam fluorescência (Figura 6), foi realizada a prova do Indol, que consiste em gotear três gotas do reativo de Kovacs (MERCK, 9293) no cultivo. A formação de anel vermelho na superfície do cultivo, confirma a presença de *E. coli*.

Com o número de “Eppendorfs” positivos, em cada diluição, utilizou-se a tabela de Mac Crady, e obteve-se o NMP de *E. coli*. Para obter o NMP de *E. coli* por grama da amostra, usou-se o cálculo a seguir:

NMP x fator de diluição intermediário x 10.

100

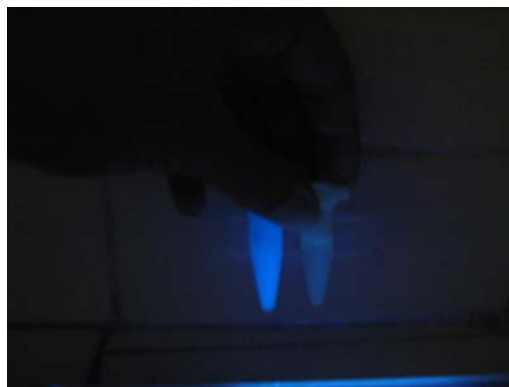


Figura 6- “Eppendorfs” colocados sob a luz ultravioleta para verificação de fluorescência, no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

3.6.2.2 Contagem de *Lactobacillus acidophilus*

O método utilizado foi o de inóculo em profundidade. Das amostras, de cada tratamento, pesava-se assepticamente uma alíquota de 25 g, em balança analítica. A alíquota era colocada em saco plástico estéril, diluída e homogeneizada com pequena quantidade de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% (MERCK, 7228) em “Stomacher” (Laboratory Blender, Stomacher 80), velocidade média por dois minutos. Depois da homogeneização o restante da SSP foi transferido totalizando 225 mL, formando a diluição 10^{-1} e em seguida as diluições seriadas consecutivas. Das diluições, inoculou-se 100 μ L em placas de Petri e posteriormente adiciona-se o meio ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS) (MERCK, 10660) previamente fundido e mantido em banho Maria (Fanem) a 55°C.

O Agar MRS é um meio enriquecido desenvolvido para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* spp. do leite, também permite o crescimento dos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* de outras origens. Contém polisorbato, acetato, magnésio e manganês que são conhecidos por agirem como fatores de crescimento especiais para bactérias lácticas (MERCK, 1996; SILVA et al., 1997).

As placas foram homogeneizadas no sentido horário e anti-horário para distribuição uniforme do crescimento das colônias. Após solidificação, foram incubadas a 35 - 37°C por 72 horas dentro de jarras de anaerobiose (BARRETO et al., 2003; GARCIA et al., 2006).

A condição de anaerobiose em jarra Gaspak® foi obtida pelo método da passivação do cobre (JURGENSEN; JURGENSEN, 1982). As placas solidificadas foram colocadas na jarra, em posição invertida.

Após incubação, foi realizada a seleção e contagem das placas que continham entre 20 e 200 colônias. O resultado final da contagem foi calculado aplicando-se a seguinte fórmula:

Resultado final = colônias contadas x diluição utilizada x fator de correção.

As colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* no meio MRS são brancas e leitosas, circulares e com bordas perfeitas (BARRETO et al., 2003).

Para a observação das características morfo-tintoriais, foram transferidas duas colônias de uma placa, de cada tratamento, para uma lâmina de vidro e foi realizado esfregaço, corado pelo método de Gram. Na prova da catalase, foi adicionada as placas peróxido de hidrogênio a 10%. Como a bactéria contada é catalase negativa, as amostras não apresentaram formação de efervescência.

Após os testes, os cultivos apresentaram prova da catalase negativa e presença de bastonetes Gram positivos, sendo então confirmados como *Lactobacillus acidophilus*.

3.7 ANÁLISE SENSORIAL

As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial, pertencente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Os métodos sensoriais utilizados foram os métodos sensoriais afetivos, teste de aceitação segundo a escala de nove pontos e teste de aceitação segundo a escala de atitude de nove pontos.

Em cada teste foram utilizados 44 julgadores, recrutados aleatoriamente entre alunos, professores e funcionários da Faculdade de Veterinária da UFF. As amostras foram servidas em cabines individuais, fracionadas em cubos de aproximadamente 20 g, dentro de copos plásticos descartáveis, codificados com números aleatórios de três dígitos.

As análises sensoriais foram realizadas no sétimo dia de fabricação dos queijos. Nas análises foram utilizados o queijo Minas Frescal (Controle), o queijo Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus* (LA-5, Chr. Hansen) e o queijo Minas Frescal adicionado de ácido láctico, respectivamente T1, T2 e T3. Os demais tratamentos não foram utilizados nas análises sensoriais, pois estavam adicionados da bactéria *E. coli*. O objetivo das análises foi verificar se há diferença, e o grau de preferência entre as fabricações.

Nos testes afetivos, os provadores receberam a amostra codificada, apresentadas sequencialmente (uma de cada vez) e em ordem balanceada. E foram orientados a marcar em uma ficha própria o grau de aceitação do produto, variando de “Gostei Extremamente” até “Desgostei Extremamente”. Para a análise de atitude a escala utilizada varia de “Comeria isto sempre que tivesse oportunidade” até “Só comeria se fosse forçado (a)” (CHAVES; SPROSSER, 2001). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO, DENSIDADE E CRIOSCOPIA DO LEITE

Os resultados referentes à composição, densidade e crioscopia do leite, utilizado na fabricação dos queijos, podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da composição (% de gordura, % de lactose, % de sólidos totais, % de proteínas, % de sais minerais), densidade e crioscopia em °H do leite utilizado na fabricação dos queijos, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

Composição	Tratamentos						Média	Desvio Padrão	CV (%)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6			
Gordura	3,94	3,91	3,94	4,85	4,87	4,82	4,39	0,4587	10,45
Lactose	4,08	4,07	4,09	4,31	4,31	4,29	4,19	0,1120	2,67
Sólidos não gordurosos	7,85	7,82	7,86	8,27	8,27	8,23	8,05	0,2074	2,58
Proteína	3,12	3,11	3,11	3,29	3,29	3,28	3,20	0,0868	2,71
Sais	0,62	0,62	0,62	0,65	0,65	0,65	0,64	0,0150	2,36
Densidade	1,030	1,030	1,030	1,028	1,028	1,028	1,030	0,0010	0,10
Crioscopia	-0,5433	-0,5422	-0,5426	-0,5603	-0,5615	-0,5609	-0,5500	0,0091	1,65

O percentual médio de gordura encontrado foi de 4,39% $\pm$ 0,4587 e a média de proteína foi de 3,20% $\pm$ 0,0868. Estes parâmetros encontram-se em conformidade com os padrões que constam na legislação, que são, respectivamente, 3,00% e 2,90% no mínimo (BRASIL, 2002a). O teor de gordura encontrado no experimento foi o parâmetro que mais sofreu variação, o que é indicado pelo alto Coeficiente de Variação (CV%) de 10,45%. Oliveira e Caruso

(1996), concluíram que dos constituintes do leite, o que apresenta maior variação é a gordura, dentro de uma faixa média de 2,0 a 6,0%. Entretanto, o teor de sais minerais é o que menos varia. Várias são as causas que podem ser apontadas como responsáveis por uma variação quantitativa na composição química do leite, dentre as principais: raça, número de ordenhas diárias, fase do período da lactação, estado nutricional da vaca, composição da alimentação, temperatura ambiental, estação do ano, idade do animal, estado de saúde da vaca. Neste experimento foi utilizado leite integral, com mais de 3,0% de gordura e apresentando variações devido a não padronização pela indústria, porém os achados estavam dentro da faixa de variação estipulada por Oliveira e Caruso (1996).

Os teores de lactose, dos tratamentos T1, T2 e T3, foram respectivamente 4,08%, 4,07% e 4,09%. A média dos sólidos não gordurosos, de todos os tratamentos efetuados na presente pesquisa, foi de 8,05%. Estes parâmetros estavam abaixo do estabelecido na legislação em vigor, pois deveriam ter no mínimo 4,30% e 8,40%, respectivamente (BRASIL, 2002a; BRASIL, 2008).

Os teores de sais minerais, obtidos nos procedimentos analíticos, desta pesquisa, em torno de 0,64%, foram compatíveis com os resultados encontrados por Oliveira e Caruso (1996).

A densidade encontrada das amostras analisadas, a 15°C, estava dentro dos limites da legislação em vigor, que é entre 1.028 e 1.033, em 100% dos tratamentos. A média dos valores de crioscopia encontrados foi de $-0,550^{\circ}\text{H} \pm 0,0091$. A crioscopia máxima, estipulada na legislação, é de $-0,530^{\circ}\text{H}$ e a mínima é de $-0,550^{\circ}\text{H}$ (BRASIL, 2002a; BRASIL, 2008).

Os valores médios para a composição e pH do leite utilizado na fabricação do queijo no presente experimento, foi de 4,39% de gordura, 3,20% de proteínas, 8,05% de sólidos não gordurosos e 6,65 de pH. Semelhantes aos encontrados por Campos e Viotto (1999) que foram respectivamente 3,06% de gordura, 3,02% de proteínas, 11,33% de sólidos totais e 6,60 de pH.

4.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DURANTE A FABRICAÇÃO

Os resultados observados na análise de pH da amostras dos queijos Minas Frescal, durante a fabricação, após as diferentes fases de produção, se encontram na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados das análises de pH realizadas durante as diferentes fases de fabricação do queijo Minas Frescal. T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*).

Fases de produção	Tratamentos						Média	Desvio Padrão	CV (%)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6			
Aquecimento do Leite	6,63	6,63	6,63	6,66	6,66	6,66	6,65	0,02	0,23
Adição dos ingredientes	6,49	6,48	6,51	6,79	6,53	6,70	6,58	0,12	1,80
Corte	6,56	6,58	6,43	6,69	6,57	6,72	6,59	0,09	1,44
mexedura	6,65	6,65	6,75	6,73	6,53	6,75	6,68	0,08	1,17
Enformagem	6,82	6,75	6,84	6,72	6,50	6,77	6,73	0,11	1,66
Primeira viragem	6,80	6,75	6,85	6,80	6,72	6,78	6,78	0,04	0,61
Última viragem	6,72	6,67	6,80	6,56	6,64	6,76	6,69	0,08	1,18
Salga	6,76	6,62	6,78	6,55	6,66	6,71	6,68	0,08	1,19
Embalagem	6,70	6,62	6,76	6,55	6,67	6,71	6,67	0,07	1,01

O pH do produto final não variou, consideravelmente, em relação ao pH do leite, o que pode ser decorrente do poder tampão do leite, conforme informações de Oliveira e Caruso (1996). Durante as diversas fases de produção dos queijos, os Coeficientes de Variação (CV) foram bem baixos, sendo o maior de 1,80, relativo à fase de adição dos ingredientes. O baixo CV, leva a interpretação de que os valores de pH também não apresentaram grandes variações entre os distintos tratamentos (Tabela 3).

Observou-se que os maiores valores médios de pH foram de 6,73 após a enformagem e de 6,78 após a primeira viragem, o que pode ser atribuído a perda de quantidades de soro devido à dessoragem e sinérese, assim também são perdidos ácidos no soro, que poderiam ser responsáveis por uma maior redução do pH.

O resultado médio dos procedimentos analíticos de pH, do leite utilizado na elaboração dos queijos, foi 6,65, estando em conformidade com os valores encontrados, para leite normal, que deve estar entre 6,60 e 6,70 conforme os citados por Cortez e Cortez (2008) e Van Dender et al., (1999).

4.3 ACIDEZ TITULÁVEL DURANTE A FABRICAÇÃO

Os resultados observados na análise de acidez titulável dos queijos Minas Frescal, durante a fabricação, após as diferentes fases de produção, se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da análise de acidez titulável, em gramas de ácido láctico/100 gramas, realizada durante as diferentes fases de fabricação dos queijos Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

Fases de produção	Tratamentos						Média	Desvio Padrão	CV (%)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6			
Aquecimento do Leite	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,17	0,0050	3,03
Adição dos ingredientes	0,18	0,18	0,17	0,35	0,36	0,36	0,26	0,0968	37,22
Corte	0,20	0,20	0,25	0,26	0,36	0,31	0,26	0,0573	21,78
Fim da mexedura	0,24	0,18	0,18	0,27	0,27	0,27	0,24	0,0403	17,15
Enformagem	0,18	0,18	0,18	0,26	0,27	0,27	0,22	0,0435	19,46
1º viragem	0,17	0,14	0,16	0,25	0,22	0,18	0,19	0,0373	19,96
Fim da viragem	0,17	0,13	0,15	0,20	0,22	0,17	0,17	0,0298	17,20
Salga	0,15	0,18	0,15	0,17	0,21	0,17	0,17	0,0203	11,85
Embalagem	0,13	0,18	0,18	0,17	0,19	0,17	0,17	0,0191	11,26

O leite destinado a fabricação dos queijos possuía valor médio de 0,17 g de ácido láctico/100 mL, sendo que 100% das amostras analisadas estavam dentro dos limites do padrão estabelecido na legislação vigente, onde consta que a acidez titulável do leite normal pode estar entre 0,14 g a 0,18 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2002a).

Foi observado que durante a fabricação, a acidez titulável aumentou após a adição dos ingredientes, para cada tratamento distinto, dependendo do tipo de ingrediente adicionado, o que pode ser caracterizado pelo alto coeficiente de variação, de 37,22% (Tabela 4). O aumento de acidez durante adição dos ingredientes foi anteriormente descrito por Spreer (1991), o qual concluiu que a coagulação faz com que as bactérias lácticas acidificantes, tornem-se fixas no gel formado, e que durante o processo, se desenvolve uma ativa fase de acidificação, que é caracterizada pela grande fermentação láctica e aumento da acidez.

Interpretando os resultados da Tabela 4, conclui-se que entre os tratamentos, a acidez no final da produção (embalagem) foi igual ou superior a 0,17 g de ácido láctico/100 g, com exceção do tratamento controle (T1, sem adição de ácido láctico ou *L. acidophilus*). Nos demais tratamentos, a média de acidez aumentada foi devida a pré-maturação pelas bactérias lácticas e pela própria adição do ácido láctico.

4.4 COMPOSIÇÃO DO QUEIJO

Os resultados referentes à composição (percentagem de gordura, proteína, cloretos, umidade e cinzas) das amostras de queijos, realizados no primeiro dia após a fabricação, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Teores médios da composição e Gordura no Extrato Seco (GES), em %, dos queijos, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), com médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

Tratamentos	Composição					
	Umidade	Cinzas	Cloretos	Proteínas	Gordura	GES
T1	64,61	4,07	1,90	16,74	18,88	53,35
T2	63,43	4,26	1,72	15,63	18,88	51,63
T3	60,74	5,08	2,05	17,30	24,55	62,53
T4	63,03	3,10	1,67	13,40	19,83	53,64
T5	61,97	4,07	1,79	16,74	26,44	69,52
T6	61,96	3,19	1,45	13,40	20,77	54,60
Média	62,62	3,96	1,76	15,54	21,56	57,55
Desvio Padrão	1,35	0,73	0,21	1,74	3,19	7,00
Coeficiente de Variação	2,16	18,55	11,63	11,20	14,78	12,16

No procedimento analítico de quantificação do teor de gordura, foi verificado que os queijos apresentaram média de 57,55% de gordura no extrato seco. Apesar de constar na legislação em vigor (BRASIL, 1996), que o queijo Minas Frescal é classificado como semi-gordo (conteúdo de gordura no extrato seco entre 25,0% e 44,9%), no presente experimento foram obtidos queijos gordos (gordura no extrato seco entre 45,0% e 59,9%) e até, nos tratamentos T3 e T5, queijos extra gordo (gordura no extrato seco de no mínimo 60%). Isto provavelmente ocorreu devido ao

maior teor de gordura do leite utilizado como matéria-prima, pois não houve uma padronização do teor de gordura do leite. Furtado (1994) relatou que nas fabricações industriais é comum a padronização para 3,0% a 3,2% de gordura.

Interpretando os resultados da Tabela 5, é possível verificar que há indícios que a maior percentagem de gordura também está relacionada aos tratamentos com ácido láctico, pois os tratamentos T3 e T5, com respectivamente 62,53% e 69,52% de gordura no extrato seco, foram as maiores percentagens encontradas. A adição de ácido láctico neste experimento aumentou a saída de soro, influenciando a umidade e a gordura do queijo produzido. Furtado (1991) narrou que como a sinérese é influenciada pela acidez, quanto maior a quantidade de ácidos, maior será a retração do coágulo. E, segundo Spreer (1991), em casos de queijos com maior acidez, a percentagem de umidade será menor e a percentagem de gordura será maior. Resultados semelhantes, aos encontrados no atual experimento, foram obtidos por Van Dender et al. (1999) que estudaram o queijo Minas Frescal, em diferentes metodologias de fabricação e também obtiveram maiores valores de gordura para os queijos fabricados com ácido láctico.

Os valores encontrados da análise de composição, no atual experimento (Tabela 5), para os queijos fabricados com ácido láctico (T3 e T5), foram semelhantes aos resultados encontrados por Lourenço Neto (1998) e Campos e Viotto (1999). Em estudo com diferentes formas de fabricação do queijo Minas Frescal, Lourenço Neto (1998) obteve os seguintes valores médios do queijo na fabricação com ácido láctico: 61,74% de umidade, 18,6% de gordura, 0,99% de cloretos e 16,27% de proteínas. Entretanto, Campos e Viotto (1999) estudando o rendimento do queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico, encontraram valores médios de: 21,67% de gordura, 1,17% de cloretos e 15,96% de proteínas.

De um modo geral, a composição físico-química do queijo Minas Frescal tradicional, com um dia de fabricação, encontrado na literatura, é bem variável. Pela observação da tabela 5, verifica-se que os teores de cloretos e gordura para o queijo Minas Frescal tradicional (T1), são respectivamente 1,90% e 18,88%, sendo semelhantes aos resultados encontrados por Furtado e Lourenço Neto (1994) e Perry (2004). Furtado e Lourenço Neto (1994) concluíram como parâmetros normais do queijo Minas Frescal: umidade entre 55% e 58%, gordura entre 17% e 19% e cloretos entre 1,4% e 1,6%. Perry (2004) sugeriu que os queijos contenham entre 0,5-2,0% de cloretos.

As percentagens de umidade encontradas no presente experimento foram de no mínimo 60,74%, portanto, estavam em conformidade com a legislação em vigor. O teor de umidade para o queijo Minas Frescal, de acordo com o estipulado na legislação, é de no mínimo 55%, pois o queijo é classificado como de muita alta umidade (BRASIL, 1996).

Os resultados da análise de composição nas amostras de queijos com adição de *L. acidophilus* (T2 e T4), no presente experimento, foram semelhantes ao queijo tradicional (T1 e T6), em todos os parâmetros estudados, não tendo indícios de diferença entre os tratamentos, conforme visualizado na Tabela 5, o que indica que o probiótico usado não alterou a composição do queijo. Resultados semelhantes aos do atual experimento, também foram encontrados por Buriti et al. (2005) e Souza (2006). Buriti et al. (2005) constataram que não ocorreu diferença significativa no rendimento, na umidade, na gordura e na proteína nos queijos com adição de *L. acidophilus*, quando comparados ao tradicional. Souza (2006) avaliou a composição centesimal do queijo Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus*, com um dia de fabricação, e obteve os seguintes resultados para o tratamento com *L. acidophilus* e para o tratamento tradicional, respectivamente: 65,57% e 66,33% de umidade, 16,22% e 15,66% de gordura, 10,04% e 12,87% de proteínas, 2,43% e 2,35% de cinzas e também não detectaram diferenças significativas entre os tratamentos, quanto ao percentual de gordura, de proteína e de cinzas.

4.5 ACIDEZ TITULÁVEL E pH DURANTE A ARMAZENAGEM

Os resultados da acidez titulável das amostras de queijo Minas Frescal, em diferentes dias, durante a armazenagem, se encontram na Figura 7.

Observa-se na figura 7 que os valores encontrados na acidez dos queijos nos tratamentos T4, T5 e T6, no 30º dia de fabricação, foram bem maiores em relação aos outros tratamentos, respectivamente 1,28 g, 0,99 g e 0,98 g de ácido láctico/100 g. A ocorrência do aumento de acidez nesses tratamentos pode ter ocorrido em virtude da adição de *E. coli*, que influenciou na acidez. Pois, segundo Brenner (1984) e Furtado (1991), a *E. coli* fermenta a lactose, originando como produto final ácido láctico e ácido acético, entre outras substâncias.

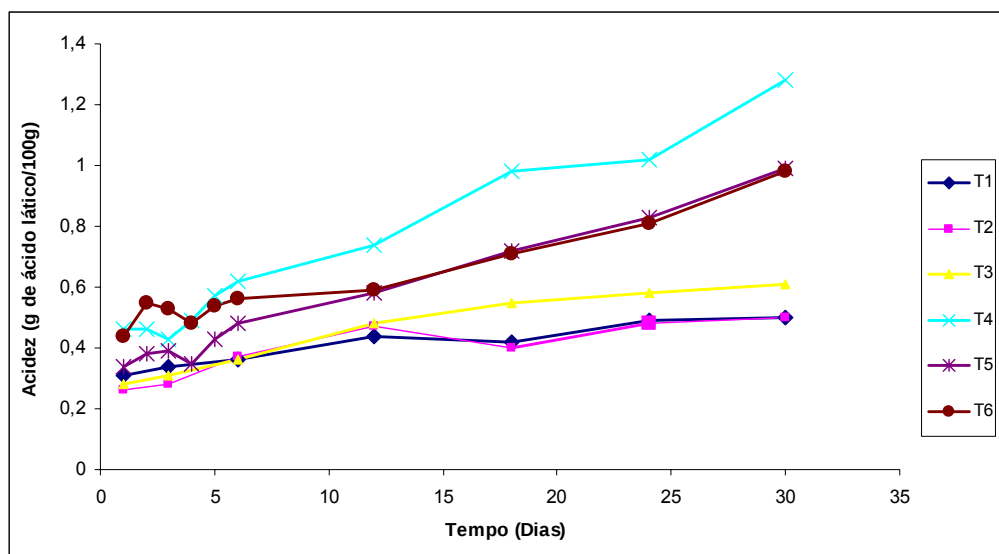


Figura 7- Representação gráfica da acidez titulável, em gramas de ácido láctico/100 gramas, ao longo do tempo de estocagem, em diferentes dias, dos queijos T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*).

No tratamento T4 (que era composto de *L. acidophilus* e *E. coli*) foi obtido maior acidez, de 1,28 g de ácido láctico/100 g. O maior aumento de acidez no T4 pode ter ocorrido em virtude da adição de *E. coli* e também do *L. acidophilus*. Pois, segundo Holt et al. (1994), o *L. acidophilus* também produz ácido láctico, durante a fermentação da lactose. A *E. coli* acidificou mais o queijo do que o *L. acidophilus*, que pode ser evidenciado pela análise do gráfico na Figura 7. No tratamento com a adição de *E. coli* (T6) foi obtido maior acidez quando comparado ao tratamento com *L. acidophilus* (T2).

Nos tratamentos sem adição da *E. coli* (T1, T2 e T3), foram obtidos pelos procedimentos analíticos, acidez de 0,50 g, 0,50 g e 0,61 g de ácido láctico/100 g, respectivamente, no 30º dia de fabricação, conforme consta na Figura 7. Não há indícios de diferença entre os tratamentos na acidez final dos queijos, principalmente entre a acidez do tratamento T2 (com *L. acidophilus*) e do tratamento T1 (tradicional). No tratamento T3 (com ácido láctico) obteve-se maior acidez.

No presente estudo, os valores encontrados de acidez titulável, para o queijo tradicional (T1) e o com ácido láctico (T3) foram, respectivamente: 0,31 g e 0,28 g de ácido láctico/100 g com um dia de fabricação, e aos 18 dias de fabricação foram 0,42 g e 0,55 g de ácido láctico/100 g. Observa-se, na figura 7, que durante a armazenagem a acidez titulável do tratamento T3 foi maior, o que também foi

verificado em experimento realizado por Van Dender et al. (1999), que analisaram o queijo Minas Frescal, adicionado de ácido láctico e na fabricação tradicional e verificaram que a acidez titulável do produto com ácido láctico foi maior. A acidez foi aumentando durante a armazenagem por 14 dias, nos dois tratamentos. Entretanto, os valores encontrados pelos autores foram bem mais altos que no presente estudo, com um dia de fabricação encontraram acidez de 0,86 g (tradicional) e 1,11 g de ácido láctico/100 g (com ácido láctico) e aos 14 dias de fabricação encontraram 1,23 g (tradicional) e 1,42 g de ácido láctico/100 g (com ácido láctico).

Foram observados, no atual experimento, que os valores de acidez titulável, no 12º dia de fabricação, nos tratamentos com *L. acidophilus* (T2) e ácido láctico (T3) foram aproximados, sendo 0,47 g (T2) e 0,48 g de ácido láctico/100 g (T3). Porém, a acidez no tratamento com ácido láctico, no 30º dia de fabricação foi maior do que o tratamento com *L. acidophilus*, sendo de 0,50 g (T2) e 0,61 g de ácido láctico/100 g (T3). Os dados do presente estudo não corroboram com os resultados encontrados por Lourenço Neto (1998), o qual observou que a acidez titulável dos queijos com a adição de culturas probiótica (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*) foi maior do que com a adição de ácido láctico, sendo os valores respectivamente, entorno de 0,60 g e 0,45 g de ácido láctico/100 g no 21º dia de armazenagem. Possivelmente, a incorporação dos outros probióticos, além do *L. acidophilus*, influenciou o aumento da acidez.

No atual experimento não foi observado diferença entre o tratamento com *L. acidophilus* e o tradicional, nos dois tratamentos a acidez aumentou ao longo do período de estocagem, conforme consta na Figura 7. Os valores encontrados no primeiro dia e no 30º dia foram, respectivamente: 0,26 g e 0,50 g de ácido láctico/100 g (tratamento com *L. acidophilus*) e 0,31 g e 0,50 g de ácido láctico/100g (tratamento tradicional). Os dados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Souza (2006) que avaliou a acidez titulável do Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus* e no tratamento tradicional e constatou que ocorreu aumento significativo da acidez, ao longo de 21 dias de armazenagem, para os dois tratamentos, porém, não ocorreu diferença significativa entre os dois tratamentos. Sendo os valores encontrados pelo autor menores que no presente estudo, os valores encontrados de acidez no primeiro dia e no 21º dia de armazenagem, foram respectivamente: 0,17 g e 0,28 g de ácido láctico/100 g (tratamento com *L. acidophilus*) e 0,18 g e 0,29 g de ácido láctico/100 g (tratamento tradicional).

A acidez ao 30º dia de fabricação, nos tratamentos T1 e T2, foram de 0,50 g de ácido láctico/100 g. Porém, Cichoski et al. (2008) quantificaram a acidez titulável do queijo Prato padrão e do queijo Prato com adição de *L. rhamnosus*, sem adição de cultura láctica starter nos queijos. Os valores da acidez encontrados para o queijo probiótico foram menores em relação ao queijo padrão, com diferença significativa em todos os 90 dias de armazenagem. Isso pode estar associado ao baixo desdobramento de lactose pela bactéria probiótica *L. rhamnosus* em pH 5,84, encontrados no queijo.

Os resultados das análises de pH, durante a armazenagem, nas amostras de queijo Minas Frescal, encontram-se na Figura 8.

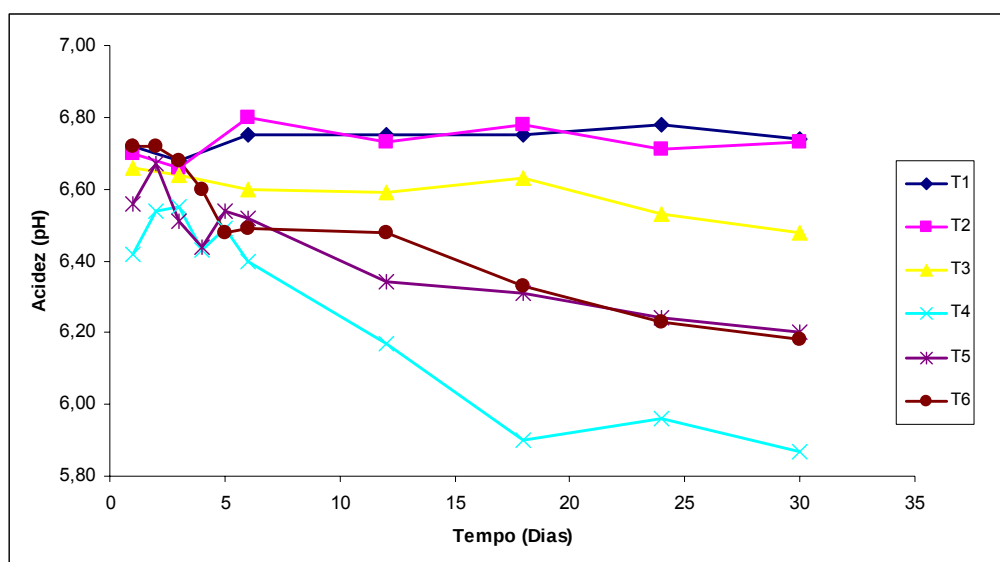


Figura 8 - Representação gráfica dos valores de pH, ao longo do tempo de estocagem, em diferentes dias, dos queijos T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*).

É possível verificar, pela interpretação da Figura 8, que nos tratamentos com a adição de *E. coli* (T4, T5 e T6), ocorreu maior redução de pH, em relação aos outros tratamentos, sendo respectivamente 5,87; 6,2 e 6,18 no 30º dia de armazenagem. No tratamento T4 (tratamento com *L. acidophilus* e *E. coli*) foi obtido à maior redução. Resultados semelhantes, quanto à redução de pH nos queijos com a adição de *E. coli*, foram observados por Rocha et al. (2006) que avaliaram o pH de sete marcas do queijo Minas Frescal comercializados em São Paulo, verificaram que seis marcas continham níveis altos de coliformes e *E. coli*, e constataram acentuada redução do pH, aos 21 dias de armazenamento, nos queijos comercializados que continham níveis altos de coliformes e *E. coli*.

No procedimento analítico de pH, o queijo Minas Frescal adicionado de ácido láctico (T3) obteve resultado de 6,66, com um dia de fabricação. Valores semelhantes foram encontrados na literatura, por Campos e Viotto (1999), Furtado e Lourenço Neto (1994) e Lourenço Neto (1998) que obtiveram resultados de pH variando de 6,1 a 6,76.

Pela observação da Figura 8, é possível observar que a diferença do pH entre o tratamento tradicional (T1) e o tratamento com adição de *L. acidophilus* (T2), no final da armazenagem (30 dias) foi de 0,1, sendo respectivamente 6,74 e 6,73. Esses resultados não são similares aos encontrados na literatura, pois Souza (2006) avaliou o pH do Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus* e no tratamento tradicional. No queijo tradicional, não ocorreu redução significativa no pH ao longo da armazenagem, porém, no queijo adicionado de probiótico, ocorreu redução significativa deste parâmetro, devido a produção de ácidos, principalmente ácido láctico, pela bactéria probiótica ao longo da armazenagem, sendo de 6,41 o valor do pH com 21 dias. Entretanto, Cichoski et al. (2008) quantificou o pH no queijo Prato padrão e com adição de *L. rhamnosus*, sem adição de cultura láctica starter nos queijos. Os valores do pH encontrados no queijo probiótico foram maiores, em todos os dias analisados, com tendência a aumento do pH ao longo do tempo de estocagem, e significativamente diferentes do queijo padrão.

Nesta pesquisa, no tratamento com ácido láctico (T3) ocorreu a maior redução de pH, entre os tratamentos sem a adição de *E. coli*, sendo de 6,48 com 30 dias de fabricação. Enquanto que, no tratamento T2 e o T1 os valores encontrados de pH foram respectivamente: 6,73 e 6,74. Os resultados, para esta variável, ora determinados, foram discordantes dos encontrados por Lourenço Neto (1998) que observou valores mais baixos de pH no queijo Minas Frescal com adição de cultura composta de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*, quando comparado ao queijo adicionado de ácido láctico. Lourenço Neto (1998) justifica que a redução de pH pode ser atribuída à produção de ácidos pelas bactérias probióticas que compõem a cultura. Os valores encontrados com 21 dias de produção foram 5,82 (com ácido láctico) e 5,56 (com a cultura probiótica). Porém, Van Dender et al. (1999) analisaram o queijo Minas Frescal, adicionado de ácido láctico e na fabricação tradicional e verificaram que não ocorreu mudança significativa no pH, durante a armazenagem por 14 dias, ao

comparar os dois tratamentos e encontraram valores de pH menores que no atual estudo, no 14º dia, cujo o pH foi 4,80 (nos dois tratamentos).

A adição do *L. acidophilus* (T2), não alterou o pH durante o armazenamento dos queijos no atual experimento, sendo o pH com um dia de fabricação de 6,70 e com 30 dias de 6,73 (Figura 8). Entretanto, esses resultados foram discordantes dos encontrados por Buriti et al. (2005) e Ribeiro et al. (2009). Buriti et al. (2005) avaliaram as implicações da incorporação de *L. acidophilus* e ácido láctico no queijo Minas Frescal, e os compararam com o tradicional, e constataram que os valores de pH tenderam a diminuir em todos os tratamentos, porém, a diminuição só foi significativa nos queijos fabricados com *L. acidophilus* e no tradicional, possivelmente pela adição nos queijos de cultura starter composta de *Lactococcus lactis* subsp *Lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *Cremoris*. No primeiro dia de fabricação, o queijo adicionado do probiótico apresentou mais alto valor de pH (6,70). Ribeiro et al. (2009) avaliaram o pH do Minas Frescal, fabricados a partir de retentados de ultrafiltração, adicionado de 10^8 UFC/g de *L. acidophilus*. Com um dia de fabricação o pH foi de 6,53. E ao final dos 28 dias de armazenagem, o pH também reduziu significativamente.

Enfatiza-se que neste experimento não foram adicionadas culturas lácticas starters, pois o objetivo foi verificar as alterações dos queijos produzidos por *L. acidophilus* e por ácido láctico, isoladamente, o que pode ter colaborado para obtenção de valores não correlatos, como os mencionados acima.

4.6 NMP DE *E. coli*

Pela interpretação dos resultados do Número Mais Provável de *E. coli*, das amostras de queijo Minas Frescal ao longo dos 30 dias de armazenagem, na Figura 9 e na Tabela 6, observa-se que ocorreu diminuição de três ciclos logarítmicos do tratamento T4 (*L. acidophilus* e *E. coli*) em relação as amostras T5 (com *E. coli* e ácido láctico) e T6 (apenas com *E. coli*), no trigésimo dia de armazenagem.

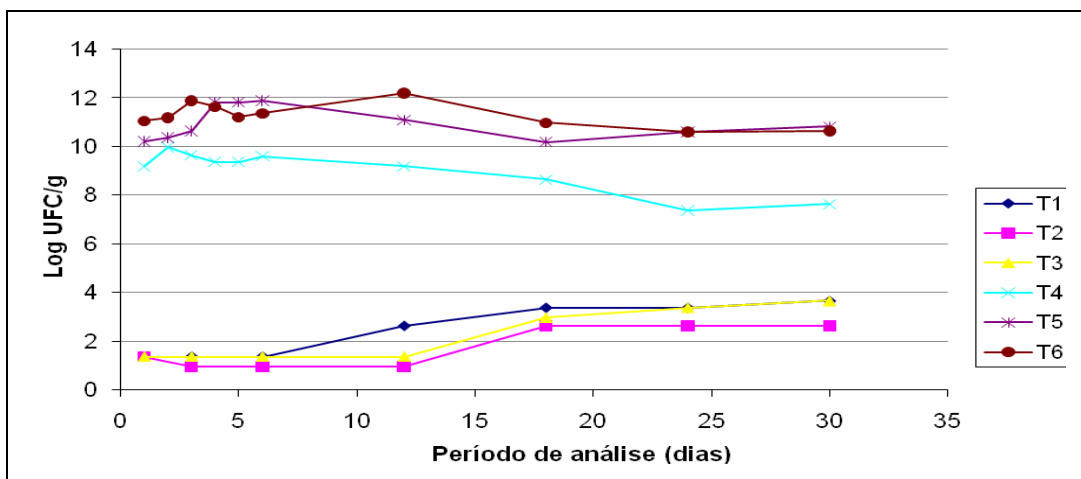


Figura 9- Resultados do NMP de *E. coli* (Log UFC/g), durante 30 dias de estocagem, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophillus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*).

Tabela 6 - Resultados do NMP de *E. coli* (Log UFC/g) do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), T4 (QMF + *L. acidophillus* + *E. coli*), T5 (QMF + ácido láctico + *E. coli*) e T6 (QMF + *E. coli*), durante 30 dias de estocagem.

Dias de estocagem	NMP de <i>E. coli</i> (Log UFC/g)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1	1,36	1,36	1,36	9,18	10,20	11,04
3	1,36	0,95	1,36	9,63	10,63	11,88
6	1,36	0,95	1,36	9,59	11,88	11,36
12	2,63	0,95	1,36	9,18	11,08	12,18
18	3,38	2,63	2,97	8,63	10,18	10,97
24	3,38	2,63	3,38	7,36	10,59	10,59
30	3,66	2,63	3,66	7,63	10,81	10,63

Nos tratamentos sem adição da *E. coli*, os queijos T1 e T3 se encontravam fora dos padrões bacteriológicos encontrados na legislação no décimo oitavo dia de armazenamento, com respectivamente 3,38 e 2,97 Log UFC/g. Entretanto, o T2 (tratamento com *L. acidophilus*) encontrava-se dentro dos padrões que constam na legislação em vigor, ainda no trigésimo dia de armazenamento, com 2,63 Log de UFC/g (Tabela 6). Consta na RDC número 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) que o limite máximo de *E. coli* para o queijo Minas Frescal é de 5×10^2 UFC/g, que corresponde a 2,70 Log UFC/g.

Todas as amostras de queijos foram elaboradas de acordo com as boas práticas de fabricação, havendo amplo controle da higiene dos utensílios empregados e da manipulação da matéria-prima e do queijo durante todo o

processamento. A contaminação inicial do leite pasteurizado estava dentro dos limites encontrados na legislação em vigor, de no máximo 4 NMP de *E. coli*/mL (BRASIL, 2001).

No atual experimento, foi verificado que a contaminação durante o processamento dos queijos aumentou em torno de um ciclo logarítmico, nos tratamentos T1, T2 e T3, quando comparado a contaminação do leite utilizado na fabricação dos queijos. Comportamento semelhante, porém com maiores níveis de contaminação, foram observados por Rocha et al. (2006) que avaliaram a evolução da contaminação de coliformes e *E. coli* durante o processamento de queijo-de-minas frescal, em laboratório, com leite pasteurizado. As populações de coliformes e de *E. coli* dos queijos preparados no laboratório aumentaram 2,5 ciclos Log (*E. coli*) e 4,5 ciclos Log (coliformes) durante o processamento, quando comparados com a contaminação presente no leite utilizado na fabricação dos queijos.

Nos tratamentos T1 e T3 ocorreu a multiplicação da *E. coli* durante a estocagem dos queijos por 30 dias, sendo em torno de 2 ciclos Logarítmicos, conforme pode ser visualizado na Figura 9. O mesmo comportamento também foi observado por Sangaletti (2007) que estudou o queijo Minas Frescal disponível nos supermercados e constatou que a contagem de *E. coli* aumentou durante o armazenamento, mesmo sob refrigeração, uma das amostras estudadas apresentou menos de 3,0 UFC de *E. coli* no primeiro dia de fabricação e no trigésimo dia apresentava a contagem de $1,66 \times 10^4$ UFC de *E. coli*.

Os queijos frescos são alimentos adequados como veículos para a incorporação de bactérias probióticas. No presente estudo, foi constatado que nos queijos com a adição de *L. acidophilus* (T4), ocorreu inibição da *E. coli*, porém a inibição foi em torno de três ciclos logarítmicos, o probiótico *L. acidophilus* não conseguiu eliminar a *E. coli*. E, também foi observado que nos queijos produzidos somente com a adição de ácido láctico (T3 e T5) não ocorreu a inibição da *E. coli*. Esses resultados, são coincidentes, com os achados, em experimento realizado por Chioda et al. (2006), o qual concluíram que o microrganismo probiótico *L. acidophilus* C1 mostrou-se eficiente na eliminação de *Listeria monocytogenes*, inoculada no queijo Minas Frescal. Porém, nesse caso, a *L. monocytogenes* foi eliminada do queijo, o que não ocorreu, no atual experimento, com a *E. coli*. E também constataram que a adição de ácido láctico durante a fabricação de queijo

Minas Frescal não apresentou efeito inibitório sob o crescimento de *L. monocytogenes*.

Avaliando a diferença no grau de contaminação do Minas Frescal com adição de ácido láctico e com adição de cultura láctica composta de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, Lourenço Neto (1998) verificou que o queijo com a adição das bactérias probióticas apresentaram menor contaminação por coliformes totais e *E. coli*, e queda no nível de contaminação ao longo do tempo de estocagem. Enquanto que, com o uso de ácido láctico aumentou a contaminação por coliformes e *E. coli*. O pesquisador ainda relata que o emprego do ácido láctico não acidificou o queijo a ponto de inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes. Esta observação também foi verificada nos resultados do presente estudo. Pela visualização da Tabela 6 observa-se que no tratamento T4 (com *L. acidophilus*) ocorreu redução das contagens ao longo do tempo de estocagem e no tratamento T5 (com ácido láctico), ocorreu aumento da contaminação.

A inibição da *E. coli* por *L. acidophilus* verificada no atual experimento, também foi comprovada por Chioda et al. (2007), Garcia et al. (2006), Guedes Neto et al. (2005) e Souza (2006). Guedes Neto et al. (2005) testaram as atividades antagonistas *in vitro* de BAL isoladas de queijo de coalho e concluíram que *Lactobacillus* spp. apresentou a melhor perspectiva de utilização na fabricação do queijo, visando melhorar a qualidade sanitária. Garcia et al. (2006) avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de nove isolados de *L. acidophilus*, a maioria apresentou fortes halos de inibição contra as bactérias testadas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Clostridium perfringens*). Souza (2006) estudou a evolução das bactérias *Staphylococcus* spp., e coliformes totais em queijo Minas Frescal adicionado de *L. acidophilus* e verificou que ocorreu inibição dos contaminantes e o mesmo não ocorreu no queijo sem o probiótico. Chioda et al. (2007), avaliaram o grau de atividade antagonista de cinco estirpes de *L. acidophilus*, e constataram que as estirpes apresentaram alto potencial para serem usados na indústria de alimentos, pois todas foram eficientes no controle da *E. coli*.

Garcia et al. (2006), Rosa e Franco (2002) e Souza (2006) concluíram que a atividade antimicrobiana do *L. acidophilus*, como a observada no atual estudo, é devido à produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil e principalmente pela produção de bacteriocinas.

A *E.coli* é considerada uma das bactérias causadoras do estufamento precoce em queijos. Entretanto, nesta pesquisa não foi visualizado estufamento precoce em nenhum dos tratamentos, mesmo com a adição da *E. coli*, o que pode ter ocorrido em virtude de a cultura de *E. coli* utilizada no experimento (tipo enteropatogênica, proveniente da Fiocruz, origem CDC 0126) não ser produtora de gás ou produzir em pouca quantidade. Os queijos produzidos no presente experimento possuíam a massa regular, sem olhaduras, conforme visualizado na figura 10. Furtado (1991), Furtado (2005), Pinto et al. (2004) e Spreer (1991) estabeleceram que o principal sinal do estufamento precoce nos queijos são um grande número de olhaduras, irregulares e pequenas, distribuídas em toda a massa.



Figura 10- Queijo Minas Frescal, do tratamento T6 (QMF + *E. coli*), produzido no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados, da Faculdade de Veterinária da UFF, em 2009.

4.7 CONTAGEM DE *Lactobacillus acidophilus*

Os resultados da Contagem de *L. acidophilus*, nas amostras dos tratamentos T2 e T4 (tratamentos onde a cultura de *L. acidophilus* foi empregada), encontram-se na Figura 11 e na Tabela 7.

Há recomendação de que a quantidade mínima viável para os microrganismos probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto, pronto para o consumo (ANVISA, 2008). Os tratamentos com adição do probiótico *L. acidophilus* (T2 e T4) possuíam populações suficientes para caracterizá-los como potencialmente probióticos, ao longo de todo o

período de armazenagem, apresentando em média 8,47 (T2) e 8,93 Log de UFC/g (T4).

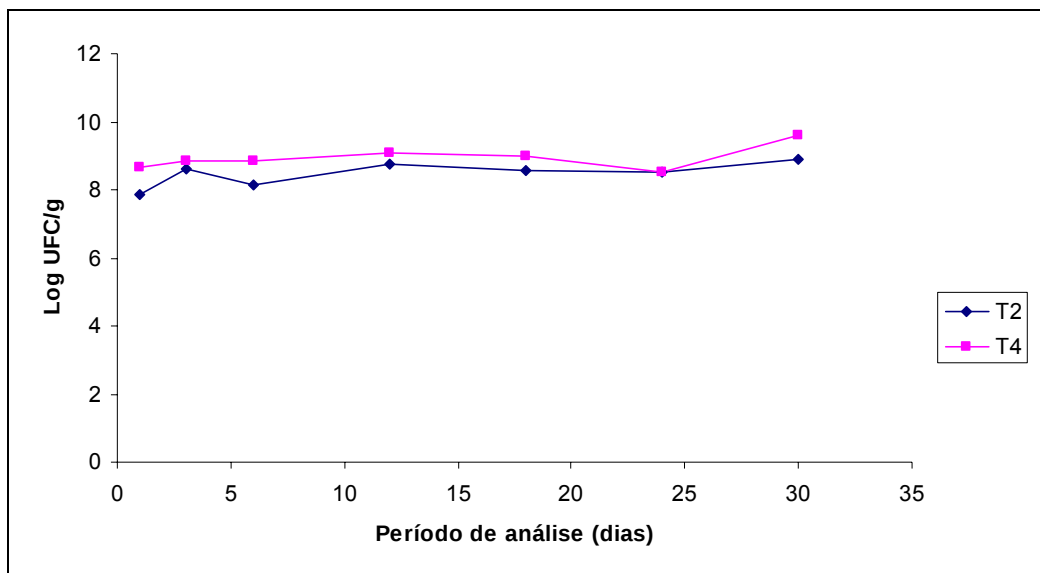


Figura 11- Representação gráfica dos resultados da Contagem de *L. acidophilus* (Log UFC/g) dos queijos que foram adicionados de *L. acidophilus*, ao longo do tempo de armazenagem.

Tabela 7 - Resultados da Contagem de *L. acidophilus* (Log UFC/g) dos queijos que foram adicionados de *L. acidophilus*, T2 (QMF + *L. acidophilus*) e T4 (QMF + *L. acidophilus* + *E. coli*), ao longo do tempo de armazenagem.

Dias de armazenagem	T2	T4
1	7,86	8,64
3	8,63	8,83
6	8,16	8,83
12	8,73	9,10
18	8,56	8,97
24	8,51	8,52
30	8,88	9,61

Na contagem de *L. acidophilus* durante a armazenagem por 30 dias a cultura empregada permaneceu em níveis altos durante todo o período de armazenagem (Figura 11). Observou-se um indicativo de aumento na contagem de *L. acidophilus*, ao longo do tempo, sendo a contagem inicial de 7,86 (T2) e 8,64 Log de UFC/g (T4) e aos 30 dias de armazenagem 8,88 (T2) e 9,61 Log de UFC/g (T4) (Tabela 7). Estes resultados estão em concordância com os encontrados por Buriti et al. (2005), que realizaram a contagem de *L. acidophilus* durante a armazenagem por 21 dias, no queijo Minas Frescal, e não observaram diferença significativa na contagem,

sendo que a bactéria se manteve viável e em níveis constantes durante toda a armazenagem. O mesmo também foi verificado por Ribeiro et al. (2009) que estudaram a sobrevivência do *L. acidophilus* adicionada nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/g, no queijo Minas Frescal e verificaram que o decréscimo da população da bactéria probiótica, ao longo do tempo, não foi significativo.

Cichoski et al. (2008) quantificaram as bactérias ácido lácticas no queijo Prato padrão e no queijo Prato com adição de *L. rhamnosus*. Com 30 dias de armazenagem, o queijo com probiótico apresentou 10^8 UFC/g, em torno de dois ciclos logarítmicos maior do que o queijo padrão (sem a adição de cultura probiótica). Na quantificação de *L. delbrueckii* em queijo tipo Cottage simbiótico, Araújo et al. (2009) verificaram que não houve diferença significativa na contagem da bactéria probiótica, durante a estocagem por 20 dias a 5°C. A média na contagem de células probióticas foi de 8,20 log UFC/g. Os resultados da contagem de probióticos, apresentados pelos autores acima citados, foram semelhantes com a contagem do presente estudo, conforme pode ser observado na figura 11.

4.8 ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados das análises sensoriais do queijo Minas Frescal, no sétimo dia de fabricação, pelo teste de aceitação, segundo a escala hedônica de nove pontos e teste de aceitação segundo a escala de atitude de nove pontos, encontram-se nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8- Resultados da análise sensorial pelo teste de aceitação segundo a escala hedônica de nove pontos, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), no sétimo dia de fabricação.

Tratamento	Médias
T1	7,0 ^{b*}
T2	7,8 ^a
T3	6,4 ^b

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa, pelo teste de Tukey, com a probabilidade de diferirem significativamente ao nível de 5%.

Tabela 9- Resultados da análise sensorial, pelo teste de atitude segundo a escala de nove pontos, do queijo Minas Frescal, T1 (QMF controle), T2 (QMF + *L. acidophilus*), T3 (QMF + ácido láctico), no sétimo dia de fabricação.

Tratamento	Médias
T1	6,6 ^{ab*}
T2	7,1 ^a
T3	6,0 ^b

*Letras iguais indicam que não há diferença significativa, pelo teste de Tukey, com a probabilidade de diferirem significativamente ao nível de 5%.

No teste de aceitação, o tratamento T2 (*L. acidophilus*), diferiu significativamente, ao nível de 5%, dos demais tratamentos (Tabela 8). Sendo o melhor aceito pelos julgadores, com termo hedônico entre gostei muito e gostei moderadamente. O tratamento T1 (controle) e T3 (com ácido láctico) não diferiram significativamente entre si, no nível de 5% de probabilidade.

No teste de atitude, o tratamento T2 não diferiu significativamente, ao nível de 5%, do tratamento T1. Sendo os mais aceitos pelos julgadores, com termo hedônico entre comeria muito frequentemente e comeria frequentemente (T2) e comeria frequentemente e gostei e comeria de vez em quando (T1). O tratamento T3 foi o menos aceito entre os julgadores, com o termo hedônico gostei e comeria de vez em quando (Tabela 9).

Nas análises sensoriais realizadas nesta pesquisa, foi verificado que a adição do microrganismo *L. acidophilus* aumentou a qualidade sensorial do queijo Minas Frescal, outros pesquisadores também verificaram melhorias sensoriais com a incorporação de *L. acidophilus*, como Buriti et al. (2005) que avaliaram sensorialmente o queijo Minas Frescal tradicional, adicionado de ácido láctico e de *L. acidophilus* e concluíram que o queijo contendo o probiótico foi o mais preferido pelos consumidores, sendo descrito como o mais agradável. Entretanto, não foi detectada diferença significativa entre os queijos. Souza (2006) avaliou as características do queijo Minas Frescal elaborado *L. acidophilus* e também verificou que a adição do microrganismo probiótico resultou em benefícios sensoriais aos produtos. Os benefícios da incorporação de *L. acidophilus* foram superiores aos dos queijos produzidos somente com acidificação direta do leite com ácido láctico. Os queijos produzidos com ácido láctico, no atual experimento, também não acrescentaram melhorias sensoriais aos produtos.

As características sensoriais desempenham papel importante na aceitação dos alimentos pelos consumidores. A melhor aceitação das amostras de queijo do tratamento com a adição do *L. acidophilus* (T2) pode ter ocorrido em virtude da produção de diacetil e acetaldeído pelo *L. acidophilus*. Oliveira et al. (2002) concluiu que diacetil e acetaldeído são dois compostos que participam do aroma de diversos produtos láteos.

5 CONCLUSÕES

Durante as diversas fases de elaboração do queijo Minas Frescal, a acidez (pH e acidez titulável) não variou consideravelmente entre os tratamentos, permanecendo a acidez final dos queijos semelhante à acidez inicial.

A adição do *L. acidophilus* não alterou as características físico-químicas em relação à composição do queijo, estando em conformidade com o encontrado na literatura e podendo ser adicionados sem prejuízos a qualidade físico-química do queijo. O queijo com a adição de ácido láctico apresentou teores de gordura maiores do que o estipulado na legislação em vigor, entretanto, nos demais parâmetros de composição não ocorreram alterações.

Durante os 30 dias de armazenagem, observou-se que ocorreu aumento da acidez titulável e redução de pH em todos os tratamentos, porém, nos tratamentos com a adição da *E. coli* foram encontrados maior redução de pH e maiores valores de acidez titulável. No queijo com a adição conjunta de *L. acidophilus* e *E. coli* ocorreu as maiores alterações dos parâmetros de acidez.

A adição do microrganismo probiótico *L. acidophilus* aumentou a segurança bacteriológica em relação a *E. coli*, pois inibiu o crescimento desta bactéria. Entretanto, a adição do ácido láctico no queijo Minas Frescal provou não ser eficaz na redução das contagens de *E. coli*.

O queijo Minas Frescal foi adequado para a incorporação da bactéria probiótica *L. acidophilus*, pois a cultura empregada permaneceu em níveis altos durante todo o período de armazenagem, apresentando populações suficientes para caracterizá-los como potencialmente probióticos.

Nos testes afetivos empregados nas análises sensoriais observou-se que o *L. acidophilus* aumentou a qualidade sensorial do queijo Minas Frescal, sendo o preferido pelos julgadores. O tratamento composto de ácido láctico obteve a pior qualidade sensorial, quando comparado aos demais tratamentos testados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; SARAIVA, C. B.; LEITE, M. O. Desenvolvimento de sorvete com prebiótico e probiótico. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora. *Anais...*, v. 59. n. 339, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes. *Substâncias Bioativas e Probióticos*, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 25/08/2008.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M. MORAES, C. A. Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 39. n. 2, p. 111-118, abr./jun. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/4285/4763>>. Acesso em: 25/08/2009.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6. n. 1, p.119-126, jan./jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/brazilianjournal/free/p03120.pdf>>. Acesso em: 17/11/2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova 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. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 set. 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 08 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº. 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº. 1.255 de 25/06/1962, nº. 1.236 de 02/09/1994, nº. 1.812 de 08/02/1996, nº. 2.244 de 04/06/1997 e nº. 6385 de 27/02/2008. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 27 fev. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos*. 4. ed. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 03 de maio de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 09 jan. 2002b.

BRENNER, D. J. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods. In: HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins, v. 1, 1984. 964p.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v. 15. n. 12, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7C4G24XBX-2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1155052661&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=876f230f59b52ab38cc8a1a275cc26ee>. Acesso em: 03/01/2010.

CAMPOS, A. C.; VIOTTO, W. H. Rendimento do queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., Juiz de Fora. *Anais...*, v. 54. n. 309, 1999.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. *Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas*. Viçosa: UFV, 2001. 81 p.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; MACRI, S. F.; TOVO, K. P.; MEDEIROS, A. A. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*, v. 101, 2006. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2006/557_558_121_124.pdf>. Acesso em: 10/09/2008.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; PIGATTO, C. P.; RIBEIRO, C. A. M. R.; RAGAZZANI, A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciencia Rural*, v. 37. n. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n2/a48v37n2.pdf>>. Acesso em: 10/09/2008.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, R. T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28. n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/29.pdf>>. Acesso em: 03/01/2010.

CORTEZ, M. A. S.; CORTEZ, N. M. S. *Qualidade do leite: boas práticas agropecuárias e ordem higiênica*. Niterói: Ed. UFF, 2008. 77 p.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. *Estatísticas do Leite*, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpql.embrapa.br/>>. Acesso em: 05/01/2010.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; SWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of Cheese Science*. Maryland: Ed. Aspen Publication, 2000. 587 p.

FRANCO, B. D. G. D. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares

predominantes. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 8., Rio de Janeiro. *Anais...*, Niterói: UFF, 2004. CD-ROM.

FURTADO, M. M. *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Ed.Globo, 1991. 297p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. *Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos*. 1. ed. São Paulo: Ed. Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. São Paulo: Ed. Fonte, 2005. 176p.

GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MEDEIROS, A. P.; POIATTI, M. L.; RAGAZANI, A. V. F.; HATAYDE, M. C.; CHIODA, T. P.; COAN, R. M.; PIGATTO, C. P.; TROVÓ, K. V. P. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Portuguesa de ciências veterinárias*, n. 101, 2006. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2006/263-268.pdf>. Acesso em: 20/09/2009.

GARDINER, G.; ROSS, R. P.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains. *Applied Environmental Microbiology*, v. 6. n. 64, 1998. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/64/6/2192>>. Acesso em: 10/09/2008.

GOMES, R. G.; THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito dos teores de soro, proteínas de soja e leite nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de bebida lácteas funcionais. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora. *Anais...*, v. 59. n. 339, 2004.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57. n. 2, p. 245-250, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57s2/28329.pdf>>. Acesso em: 26/12/2009.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. SNEATH, P.H. A.; STALEY, J. T. WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 787p.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3 ed. Zagarosa: Ed. Acribia, 1994. 804p

JURGENSEN, C. A.; JURGENSEN, L. D. Passivação de cobre, alternativa para a obtenção da condição de anaerobiose. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, n.2, 1982.

KANDLER, K.; WEISS, N. Regular, Nonsporing Gram positive Rods. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v.2, 1984. 1586p.

LOURENÇO NETO, J. P. M. Uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal com alternativa de melhoria de qualidade. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL QUEIJOS FRESCOS, 1., São Paulo. p. 59-75, 1998.

MERCK. *Microbiology Manual*. Darmstadt: Germany, 1996. 405p.

NES, I. F.; DIEP, D. P.; HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 60. n. 2, 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/n17311v043713221/>>. Acesso em: 15/11/2009.

OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. G. B. *Leite*: obtenção e qualidade do produto fluido e derivados. v. 2. Piracicaba: FEALQ, 1996. 80p.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. *Higiene Alimentar*, v. 12, p.31-35, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352007000600033>. Acesso em: 10/09/2008.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 38. n. 1, jan./mar. 2002. Disponível em: <<http://www.rbcf.usp.br/Edicoes/Volumes/v38N1/PDF/v38n1p1-21.pdf>>. Acesso em: 10/01/2010.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo-de-minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51. n. 5, 1999. Disponível em: <http://www.journaldatabase.org/articles/38056/Enumeracao_de_coliformes_.html>. Acesso em: 10/09/2008.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v. 27. n. 2, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422004000200020&script=sci_arttext#back1>. Acesso em: 10/12/2009.

PINTO, C. P.; MASCARENHAS, M. O.; FIGUEIREDO, H. M.; TESHIMA, E. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade microbiológica. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora. *Anais...*, v. 59. n. 339, 2004.

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

2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n1/v29n1a04.pdf>>. Acesso em: 20/06/2009.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetic*, n. 32, 1998. Disponível em: <<http://www.accessmylibrary.com/article-1G1-54257677/molecular-mechanisms-bacteriocin-evolution.html>>. Acesso em: 28/12/2009.

ROCHA, F. C. A.; SAAD, J. S.; BURITI, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58. n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352006000200016>. Acesso em: 10/09/2008.

ROSA, M. C.; FRANCO, G. D. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Conscientiae Saúde*, v. 1, 2002. Disponível em: <<http://www4.uninove.br/ojs/index.php/saude/article/view/156/149>>. Acesso em: 28/12/2009.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42. n. 1, jan./mar. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n1/29855.pdf>>. Acesso em: 25/07/2009.

SANDERS, M. E.; O'SULLIVAN, D. J. Probiotics: Considerations for Human Health. *Nutrition Reviews*, v. 61. n. 3, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723641>>. Acesso em: 10/12/2008.

SANGALETTI, N. *Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado*. Piracicaba, 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-19102007-100720/>>. Acesso em: 14/01/2010.

SCOTT, R; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. *Cheesemaking practice*. 3 ed. Maryland: Ed. Aspen Publication, 1998. 449p.

SHORTT, C.; O'BRIEN, J. *Handook of functional dairy products*. Florida: CRC Press, 2004. 293 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; *Manual de métodos de análise microbiológicas em alimentos*. São Paulo: Ed. Livraria Varela, 1997. 295 p.

SOUZA, C. H. B. *Influência de uma cultura 'starter' termofílica sobre a viabilidade de "Lactobacillus acidophilus" e as características de queijo minas frescal probiótico*. São Paulo, 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-07122006-153517/>>. Acesso em: 10/11/2006.

SPREER, E. *Lactologia industrial*. 2 ed. Zagazosa: Ed. Acribia, 1991. 617p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 718 p.

VAN DENDER, A. G. F.; MASSAGUER-ROIG, S.; CAMPOS, S. D. S.; Alterações físico-químicas e vida-de-prateleira do queijo Minas frescal tradicional e fabricado pelo método MMV. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., Juiz de Fora. *Anais...*, v. 54. n. 309, 1999.

WONG, N. P. *Fundamentals of dairy chemistry*. 3 ed. Nova York: Van Nostrand Reinhold Company, 1988. 779p.

7 ANEXO

7.1 FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL, PARA O TESTE DE ACEITAÇÃO SEGUNDO A ESCALA HEDÔNICA DE NOVE PONTOS E A ESCALA DE ATITUDE DE NOVE PONTOS

Nome: Data:..... Sexo.....Idade:.....

CÓDIGO DA AMOSTRA:.....684.....

Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.

- 9 - gostei extremamente
- 8 - gostei muito
- 7 - gostei moderadamente
- 6 - gostei ligeiramente
- 5 - nem gostei/nem desgostei
- 4 - desgostei ligeiramente
- 3 - desgostei moderadamente
- 2 - desgostei muito
- 1 - desgostei extremamente

Comentários: _____

Por favor, avalie a amostra e use a escala abaixo para indicar o quanto você estaria disposto a consumir esse produto.

- 9 - comeria sempre que tivesse oportunidade
- 8 - comeria muito frequentemente
- 7 - comeria frequentemente
- 6 - gostei e comeria de vez em quando
- 5 - comeria se estivesse acessível, não me esforçaria para consegui-lo
- 4 - não gostei, mas comeria ocasionalmente
- 3 - raramente comeria
- 2 - só comeria se não pudesse escolher outro alimento
- 1 - só comeria se fosse forçado

Comentários: _____