



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

SIMONE FARIA SILVA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE EMBALAGEM NA ESTABILIDADE
DO QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO E NA VIABILIDADE DA
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis***

CAMPINAS

2016

SIMONE FARIA SILVA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE EMBALAGEM NA ESTABILIDADE
DO QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO E NA VIABILIDADE DA
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis***

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutora em Tecnologia de Alimentos.*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos

Este exemplar corresponde à versão final
da tese defendida pela aluna Simone
Faria Silva e orientada pelo Prof. Dr.
Carlos Alberto Rodrigues Anjos

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

Si38a Silva, Simone Faria, 1982-
Avaliação de sistemas de embalagem na estabilidade do queijo Minas Frescal probiótico e na viabilidade da *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* / Simone Faria Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Carlos Alberto Rodrigues Anjos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Atmosfera modificada. 2. Queijo. 3. Probióticos. 4. Viabilidade. I. Anjos, Carlos Alberto Rodrigues, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of packaging systems in the stability of probiotic Minas Frescal cheese and in the viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Palavras-chave em inglês:

Modified atmosphere

Cheese

Probiotics

Viability

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Carlos Alberto Rodrigues Anjos [Orientador]

Adriano Gomes da Cruz

Beatriz Maria Curtio Soares

Leila Maria Spadoti

Rodrigo Rodrigues Petrus

Data de defesa: 22-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos (Orientador)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (Membro Titular)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Dra. Beatriz Maria Curtio Soares (Membro Titular)
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Leila Maria Spadoti (Membro Titular)
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus (Membro Titular)
Universidade de São Paulo

Dra. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender (Membro Suplente)
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira (Membro Suplente)
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Helena Maria Andre Bolini (Membro Suplente)
Universidade Estadual de Campinas

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos Membros Titulares encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Simone Faria Silva.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Maria e Francisco; aos meus irmãos, Fernanda, Guilherme e Henrique; às minhas sobrinhas Gabi e Alice; aos que verdadeiramente contribuíram para este fim; e àqueles que deixam de lado o ego e as disputas de poder para se ocuparem da sua real função no ensino e no desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida;

Aos meus pais, pelo amor, apoio e constante incentivo.

Aos meus irmãos e familiares, pela torcida.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos, por aceitar-me como aluna e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/FEA), por possibilitar a realização do Doutorado e contribuir para meu desenvolvimento acadêmico e científico;

À amiga Eliene, que me apoiou e esteve presente nos momentos em que o tempo se fazia curto. Sem sua ajuda seria difícil concluir este trabalho;

Ao Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz, que cedeu recursos materiais e conhecimentos para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Rodrigo Nunes Cavalcanti, pelo comprometimento, disposição e ajuda no tratamento dos dados de reologia.

À Alice Kimie, técnica do Laboratório de Embalagem e Estabilidade de Alimentos, que sempre esteve à disposição para ajudar;

Ao Prof. Dr. José de Assis F. Faria que mostrou-se aberto e apoiou-me quando desmontei interesse por esta área de estudo;

Ao colega Alexandre pela disposição nos dias de processamento em Pirassununga;

À Lígia, Cecília, Gra, Karina e Diogo, pelo companheirismo desde o mestrado até então;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP, campus Pirassununga) e ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela disponibilização dos insumos e bens materiais na realização dos processamentos dos queijos. Esta ajuda foi indispensável para a realização deste trabalho;

Ao Sr. Osvaldo Dias Lopes, técnico do Laticínio-Escola da FZEA/USP, por transferir seu conhecimento prático, pela boa-vontade e disposição durante todos os processamentos;

À empresa Chr. Hansen, pelo fornecimento da cultura BB-12[®];

À empresa Norpack Embalagens Especiais Ltda., pelo fornecimento das embalagens plásticas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

E aos que possibilitam um ensino público de qualidade nas Instituições de Educação e Pesquisa deste País.

RESUMO

Uma vez que a *Bifidobacterium* BB-12[®] é um micro-organismo estritamente anaeróbio, seu uso na produção de alimentos probióticos se torna um desafio. Os sistemas de embalagem que impedem o contato da bactéria com o oxigênio tornam-se uma alternativa viável. Neste projeto foram avaliados os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais do queijo Minas Frescal probiótico acondicionado em sistemas de embalagem com atmosfera modificada (AM) composta por diferentes concentrações dos gases CO₂ e N₂, ou com vácuo, utilizando embalagem laminada de Nylon/PEBD; e um sistema sem AM em embalagem de PEBD. As amostras foram estocadas a 5 °C durante 21 dias e sua estabilidade foi avaliada com análises físico-químicas (pH, acidez titulável, umidade, atividade proteolítica, quantificação de ácidos orgânicos), microbiológicas (viabilidade da cultura probiótica na estocagem e nas condições do trato gastrointestinal), reológicas (TPA, *creep test* e compressão axial) e sensorial (teste de aceitação, ideal de textura e gosto ácido). Os queijos acondicionados nos sistemas de embalagem com AM ou vácuo apresentaram maiores contagens de bifidobactérias e, conseqüentemente, maiores concentrações de ácido acético. Não foi possível identificar uma correlação entre os sistemas de embalagem e as propriedades reológicas avaliadas. Assim como não foi percebida diferença na avaliação sensorial dos tratamentos, de maneira que o queijo Minas Frescal probiótico teve boa aceitação e intenção de compra. De forma geral, as embalagens com AM e vácuo proporcionaram maior viabilidade das bifidobactérias e a manutenção da estabilidade físico-química e sensorial do queijo. Assim, embalagens com supressão de oxigênio representam um requisito importante a ser considerado pela indústria de alimentos probióticos, independente do tipo de tratamento, desde que utilize um material com alta barreira aos gases e selagem adequada que mantenha a anaerobiose do espaço interno da embalagem.

ABSTRACT

Bifidobacterium BB-12[®] is a strictly anaerobic microorganism, and, in consequence, its use in the production of probiotic foods becomes a challenge. Packaging systems that prevent the contact of the bacteria with oxygen become a viable alternative. This project evaluated physicochemical, microbiological, rheological and sensory parameters of Minas Frescal probiotic cheese in packaging systems with modified atmosphere (MA) composed by different concentrations of CO₂ and N₂ or vacuum, using Nylon / LDPE laminated packaging; and LDPE packaging without MA. The samples were stored at 5 °C for 21 days and its stability was evaluated with physicochemical (pH, acidity, moisture, proteolytic activity, quantification of organic acids), microbiological (viability of probiotic culture during the storage and the survival in simulated gastrointestinal conditions), rheological (TPA, creep test and axial compression) and sensory analysis (acceptance testing and ideal-point scale of texture and sour taste). The samples in packaging systems with MA or vacuum had higher bifidobacterial counts and hence, higher concentrations of acetic acid. No correlation was found between the packaging systems and the rheological properties assessed. It was not perceived difference in sensory evaluation of treatments, so that the Minas Frescal probiotic cheese had good acceptance and purchase intent. Overall, the MA and vacuum packaging provided greater viability of bifidobacteria and maintenance of the physicochemical stability and sensory cheese characteristics. Thus, packages with suppression of oxygen represent an important requirement to be considered by the probiotic foods industry. Regardless the atmosphere applied, it becomes essential to provide an anaerobic atmosphere inside the package by using a material with high barrier to gases and a proper sealing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Fatores que afetam a viabilidade e estabilidade dos probióticos. Adaptado de Saarela (2007).....25
- Figura 2. Fluxograma de produção do Queijo Minas Frescal probiótico.41
- Figura 3. Microscopia óptica de colônias de *Bifidobacterium lactis* – BB12[®] isoladas de queijo Minas Frescal. Lente objetiva 100X.....54
- Figura 4. Contagem de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] em queijo Minas Frescal probiótico sob diferentes sistemas de embalagem durante 21 dias de estocagem a 5±1°C. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.....56
- Figura 5. Viabilidade do micro-organismo *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] ao teste entérico realizado após 21 dias de estocagem do queijo Minas Frescal a 5±1°C em diferentes sistemas de embalagem. seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.....59
- Figura 6. Concentração dos ácidos orgânicos (acético, láctico e cítrico) no decorrer de 21 dias de estocagem a 5±1°C do queijo Minas Frescal probiótico acondicionados sob diferentes sistemas de embalagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.....63

Figura 7. Queijo Minas Frescal probiótico com 21 dias de estocagem refrigerada a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.....65

Figura 8. Comportamento dos gases O_2 e CO_2 no espaço livre dos sistemas de embalagem durante a estocagem do queijo Minas Frescal probiótico a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.69

Figura 9. Intenção de compra baseada na avaliação visual do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo. 81

Figura 10. Intenção de compra das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.82

Figura 11. Ideal de gosto ácido das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas

com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.84

Figura 12. Ideal de textura das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b}
Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição físico-química e contagem do <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 [®] no queijo Minas Frescal probiótico após 1 dia de estocagem a 5±1°C e da amostra comercial.....	53
Tabela 2. Viabilidade da <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 [®] em queijo Minas Frescal probiótico sob diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem refrigerada a 5±1°C.....	58
Tabela 3. Composição em ácidos orgânicos do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem refrigerada a 5±1°C.	62
Tabela 4. Composição físico-química do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem a 5±1°C.	66
Tabela 5. Análise de perfil de textura das amostras de queijo Minas Frescal probiótico.....	72
Tabela 6. Parâmetros de compressão uniaxial estimados E (módulo de elasticidade), ϵ_{rup} (deformação de ruptura), σ_{rup} (tensão de ruptura) e W_{rup} (trabalho de ruptura) para as amostras de queijo Minas Frescal probiótico.	75
Tabela 7. Parâmetros de compliância estimados J_0 (compliância instantânea), J_1 (compliância viscoelástica), τ (tempo de retardo) e η_N (viscosidade Newtoniana) para as amostras de queijo Minas Frescal probiótico.....	78
Tabela 8. Médias e desvios padrão dos testes afetivos de avaliação visual e aceitação sensorial do queijo Minas Frescal probiótico estocado a 5±1°C e da amostra comercial.	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Queijo Minas Frescal.....	20
2.2	Alimentos Probióticos.....	20
2.3	Consumo de produtos probióticos e saúde.....	26
2.4	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	28
2.5	Queijos como carreadores de probióticos.....	32
2.6	Sistema de embalagem com atmosfera modificada e a vácuo.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Processamento do Queijo Minas Frescal Probiótico.....	39
3.2	Análises físico-químicas e microbiológicas de caracterização e avaliação da estabilidade.....	41
3.2.1	Determinação do pH.....	42
3.2.2	Acidez Titulável.....	43
3.2.3	Umidade.....	43
3.2.4	Gordura Total.....	43
3.2.5	Proteína Total.....	43
3.2.6	Atividade Proteolítica.....	43
3.2.7	Determinação de ácidos orgânicos.....	44
3.2.8	Análises reológicas.....	45
3.2.9	Contagem seletiva da cultura probiótica.....	48
3.2.10	Viabilidade às condições do trato gastrointestinal.....	48
3.3	Avaliação Sensorial.....	49
3.4	Caracterização do Sistema de Embalagem.....	50

3.5	Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Caracterização físico-química e microbiológica do leite e do queijo Minas Frescal	52
4.2	Viabilidade da bactéria <i>Bifidobacterium lactis</i> durante o tempo de estocagem e na simulação ao trato gastrointestinal.....	54
4.3	Quantificação de ácidos orgânicos acético, láctico e cítrico	59
4.4	Avaliação da acidez titulável, pH, umidade e atividade proteolítica	64
4.5	Taxa de permeabilidade ao oxigênio do laminado e composição gasosa do interior da embalagem.....	66
4.6	Análises reológicas	70
4.6.1	TPA.....	70
4.6.2	Compressão Uniaxial.....	73
4.6.3	<i>Creep</i>	76
4.7	Avaliação sensorial	79
5	CONCLUSÃO	86
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	ANEXO 1.....	100
	ANEXO 2.....	103
	ANEXO 3.....	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento previsto do consumo mundial de queijo entre 2015 e 2021 é de aproximadamente 10%, segundo dados da OCDE/FAO (2015). Com consumidores mais conscientizados sobre a importância de uma boa alimentação, é esperado um aumento da popularidade do queijo fresco e dos queijos magros. Entre 2013 e 2014, o queijo frescal foi responsável por 50% do crescimento do valor absoluto do mercado global de queijo, impulsionado pela inovação de produtos e aumento da penetração (LEITE & DERIVADOS, 2015).

De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, o consumo de queijo no Brasil passou de 3,5 kg per capita em 2008 para 5 kg em 2014 (LEITE & DERIVADOS, 2015). A entidade projeta um consumo próximo de 7,3 kg de queijo por habitante em 2020, o que representa uma evolução de 46% frente à quantidade atual de 5 kg por pessoa em todo o país. A previsão é que os volumes de queijos vendidos cresçam, em média, 11,4% ao ano entre 2014 e 2017, e os valores anuais de venda 11,1% ao ano (LEITE & DERIVADOS, 2015).

O queijo branco é consumido por 72% da população brasileira (LEITE & DERIVADOS, 2015). As variedades com baixa quantidade de gorduras, caso da ricota e do queijo Minas Frescal, agradam cada vez mais aos consumidores por causa do aumento do número de adeptos de um estilo de vida mais saudável. O queijo Minas Frescal ocupa a quinta posição em produção no país, atrás apenas dos queijos tipo muçarela, prato e requeijões culinário e cremoso (LEITE & DERIVADOS, 2015).

O queijo Minas Frescal é definido como um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Segundo o Regulamento Técnico de Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal este é classificado como um queijo semi-gordo, de 25 a 44,90% de gordura, e de muito alta umidade (maior que 55%) (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997; BRASIL, 2004). Embora seja um queijo fresco, de consumo direto, o queijo Minas Frescal

sofre alterações durante o período de estocagem. Devido à sua alta umidade, esse queijo deve ser estocado sob refrigeração, a fim de prevenir o desenvolvimento de micro-organismos e retardar a acidificação e a proteólise, que são as principais modificações que afetam sua durabilidade (CAMPOS, 2000).

O queijo é um dos produtos alimentícios mais versáteis disponíveis atualmente e oferece oportunidades para muitas estratégias de mercado, como, por exemplo, a possibilidade de ser um alimento carreador de bactérias probióticas (CRUZ et al., 2011).

Os probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FOOD/WHO, 2001). O alimento probiótico é definido como um produto processado que contém micro-organismos probióticos viáveis em uma matriz adequada e em suficiente concentração (SAXELIN, 2008). Isso significa que a viabilidade e a atividade metabólica desses micro-organismos devem ser mantidas em todas as etapas de processamento do alimento, desde a manufatura até a ingestão pelo consumidor e que eles devem ser capazes de sobreviver às condições do trato gastrointestinal (SANZ, 2007).

Dentre os efeitos benéficos que os probióticos podem trazer à saúde humana, podem ser citados: controle de infecções intestinais e estímulo do trânsito intestinal com consequente diminuição da constipação. Os probióticos também podem melhorar a absorção de nutrientes e auxiliar na digestão da lactose, prevenindo os sintomas da intolerância à lactose. Além disso, podem auxiliar na redução dos níveis de colesterol, estimular a produção de anticorpos, além de possuírem efeitos anticarcinogênicos (CRUZ, FARIA, VAN DENDER, 2007). Também podem atuar estimulando o crescimento de outros micro-organismos benéficos, em detrimento aos prejudiciais, e assim reforçando os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

No Brasil, a legislação em vigor determina que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC na recomendação diária do produto e que esta informação deve constar no rótulo (BRASIL, 2008). Do ponto de vista tecnológico, a manutenção da viabilidade da bactéria probiótica durante a

estocagem representa um desafio significativo, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição ao oxigênio, calor e ácidos, o que pode resultar na perda da funcionalidade do produto (STANTON et al., 2003). Dentre esses fatores, a exposição ao oxigênio – denominado estresse oxidativo – vem recebendo atenção especial da comunidade científica e várias soluções tecnológicas têm sido apresentadas.

A utilização de queijos como veículo de probióticos é vantajosa, uma vez que os queijos são produtos que conferem proteção às bactérias probióticas contra a ação do oxigênio durante a estocagem, ao pH ácido e aos sais biliares durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. O conjunto de características que inclui, entre outras, valor de pH superior a 5, atividade de água normalmente elevada, matriz sólida (que facilita o “encaixe da bactéria”) e concentração relativamente elevada de gordura, leva a crer que esses produtos sejam mais adequados como veículos de probióticos que leites fermentados e iogurtes (GARDINER et al., 1998).

Dentre os micro-organismos probióticos, as bactérias do gênero *Bifidobacterium* estão entre as mais utilizadas pela indústria e apresentam uma boa adaptação e fixação no trato gastrointestinal. No entanto, seu uso na industrialização de alimentos probióticos representa um desafio uma vez que esta bactéria é estritamente anaeróbica. É sabido que a embalagem representa um importante fator na manutenção da viabilidade das bactérias durante a estocagem de produtos probióticos. Entre as tecnologias de embalagens desenvolvidas para a indústria de alimentos, a Embalagem com Atmosfera Modificada (AM) liderou a evolução dos métodos de conservação dos alimentos frescos e minimamente processados. A tecnologia de AM é utilizada para alterar o ambiente gasoso em torno do alimento com a finalidade de prolongar sua vida de prateleira. A AM é usada amplamente na estocagem e distribuição de alimentos. Como os queijos de alta umidade apresentam uma textura macia, a AM se mostra muito adequada por apresentar um efeito “almofadado” proporcionado pela injeção de gás. Outro benefício da atmosfera modificada seria a saturação do espaço livre das embalagens de queijos macios semi-gordos. Um material de embalagem com alta barreira aos gases se torna indispensável na AM para evitar que os gases injetados permeiem através da parede da embalagem, bem como das áreas de fechamento (BRODY, 1995).

No entanto, apesar da AM representar uma prática de fácil aplicação para a indústria de alimentos probióticos, existem poucas pesquisas mostrando o comportamento dessas bactérias quando submetidas a diferentes concentrações de gases de enchimento ou a vácuo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento da cultura de *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* quando incorporada ao queijo Minas Frescal acondicionado em atmosferas de CO₂ e N₂ ou a vácuo, além de avaliar a viabilidade da bifidobactéria às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal após 21 dias de estocagem refrigerada, além dos parâmetros físico-químicos, reológicos e sensoriais do queijo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil e se caracteriza como um queijo branco, fresco, macio com leve gosto salgado e suave sabor de ácido lático (CUNHA et al., 2006).

Este queijo é tradicionalmente produzido pela coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho, complementada pela ação de cultura *starter* mesofílica do tipo “O” constituída pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (BURITI et al., 2005a). No entanto, o uso da cultura *starter* do tipo “O” causa uma excessiva acidificação do queijo durante a estocagem (LAW, 1999). Com isso, atualmente a indústria brasileira tem substituído, parcial ou totalmente, o fermento lático do processo tradicional, pela acidificação direta com ácido lático. Essa alteração no processo de fabricação permite reduzir o consumo de coalho, aumentar o rendimento e a capacidade de retenção de água, além de diminuir e padronizar a acidez (CAMPOS, 2000), uma vez que restringe o decréscimo do pH ao processo de fabricação. Os benefícios decorrentes da substituição podem ser estendidos às características sensoriais do produto, melhorando a textura e reduzindo o gosto ácido. No entanto, a ausência da cultura *starter* pode não ser microbiologicamente segura, uma vez que a adição desta cultura assegura uma produção permanente de ácido lático e um baixo valor de pH do produto durante a estocagem, assim como a produção de compostos antimicrobianos (BURITI et al., 2005b).

2.2 Alimentos Probióticos

Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD/WHO, 2001).

De acordo com Guarner et al. (2008), embora haja consenso científico, não existe nenhuma definição legal do termo probiótico. Como critérios mínimos exigidos para o alimento probiótico, estão:

- O micro-organismo deve estar especificado por gênero e cepa;
- O produto deve conter bactérias vivas;
- Ser administrado em dose adequada até o fim de sua vida útil (com variabilidade mínima entre lotes do produto);
- Ter demonstrado eficácia em estudos controlados com humanos.

Ainda, segundo Guarner et al. (2008), não é possível estabelecer uma dose geral para os probióticos. A dosagem tem que estar baseada em estudos com humanos que mostrem algum benefício à saúde. Porém, a comunidade científica estabelece como quantidades terapêuticas, concentrações de probióticos entre 10^6 e 10^7 UFC/g no produto final, atingindo 10^8 e 10^9 UFC, proveniente de um consumo diário de 100 g ou 100 mL do alimento (TALWALKAR et al., 2004). No Brasil, a legislação vigente afirma que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC por dose diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008).

A viabilidade e estabilidade dos micro-organismos probióticos podem ser melhoradas em vários estágios, o que inclui a seleção e aprimoramento das propriedades de resistência das linhagens, as condições de produção, formulação, embalagem e estocagem de produtos. Sempre que possível, uma cepa probiótica deve ser escolhida com base nas suas propriedades de sobrevivência, bem como na robustez tecnológica. Como tanto as propriedades funcionais quanto as tecnológicas podem variar consideravelmente dentro de um gênero e até mesmo dentro de uma espécie, quando do desenvolvimento de um produto probiótico, as propriedades tecnológicas das cepas devem ser consideradas desde a fase inicial. No entanto, devido às limitações inerentes da adaptabilidade de bactérias originárias do trato intestinal de sobreviver fora do seu ambiente natural, é sempre uma tarefa difícil manter a viabilidade e estabilidade dos probióticos durante o processamento (SAARELA, 2007).

Em geral, existem 5 pontos principais a serem abordados ao incorporar probióticos em alimentos:

1. Seleção de uma combinação de cepa e alimento probiótico compatível.
2. Condições de processamento do alimento compatíveis com a sobrevivência do probiótico.
3. Quando a fermentação for necessária, garantir que a matriz do alimento apoie o desenvolvimento do probiótico.
4. Seleção de uma matriz do produto, de embalagem e das condições ambientais adequadas para garantir a sobrevivência do micro-organismo probiótico durante a cadeia de suprimento e no tempo de estocagem.
5. Garantia de que a adição do probiótico não cause impacto adverso sobre o sabor e textura do produto.

A viabilidade é apenas um indicador da atividade probiótica. No entanto, uma vez que a capacidade dos organismos probióticos de conferir benefícios à saúde do hospedeiro é somente quantificável através de estudos clínicos ou em animais, a viabilidade continua sendo a única maneira prática de mensurar a qualidade dos probióticos. Em estudos clínicos, são atribuídos benefícios à saúde a doses de 10^{8-9} células viáveis de probióticos por dia. No entanto, órgãos consultivos e regulamentadores geralmente estipulam que os alimentos que contêm organismos probióticos necessitam ter mais que $10^6 - 10^7$ UFC/g no momento do consumo (LEE, 2009a).

Os alimentos probióticos devem apresentar aroma e sabor agradáveis, e, o que é mais importante, as cepas devem ser resistentes e estáveis o suficiente para suportar os processos convencionais de produção industrial. Assim, segundo Lee (2009b) alguns critérios devem ser atendidos, como:

- Facilidade de manutenção durante o armazenamento sem perda de viabilidade;

- Capacidade de reativação e rápida multiplicação para a concentração máxima em um meio de fermentação simples e barato;
- Capacidade para sobreviver e crescer em condições aeróbias ou microaerófilas;
- Capacidade para suportar a manipulação física sem perda significativa de viabilidade;
- Capacidade para sobreviver nas matrizes alimentares e durante o processamento.

Vários critérios são utilizados para selecionar as linhagens de bactérias probióticas, sendo os mais comumente empregados: a sobrevivência nas condições de estresse gastrointestinal (baixo pH e a concentração de sais biliares), a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal (relacionada com a aderência ao muco e/ou epitélio intestinal, a atividade anti-microbiana pela produção de moléculas antimicrobianas ou a capacidade de inibir/deslocar a adesão de agentes patogénicos). Testes *in vitro* e *in vivo* são utilizados para a identificação de tais características, embora haja falta de uma metodologia padronizada ou unificada para a avaliação da funcionalidade do probiótico (LEE, 2009a).

O micro-organismo probiótico quando adicionado ao alimento passa por diferentes seções do trato gastrointestinal com tempos e condições de estresse variáveis. Após a mastigação, a primeira barreira que a bactéria deve superar são os baixos valores de pH do estômago, que variam de 1 a 3, em um tempo de exposição de 90 minutos. No duodeno o pH aumenta para 6,0 - 6,5, mas os sais biliares são liberados pela vesícula biliar até atingir concentrações que variam de 1,5 a 2,0 % durante a primeira hora de digestão, diminuindo para valores menores ou iguais a 0,3 % m/v. O período de residência no intestino delgado até 50 % de esvaziamento varia entre 2,5 e 3 horas e o trânsito através do cólon pode levar até 40 horas. Neste local valores de pH próximo ao neutro (5,5 – 7,0) e a concentração fisiológica dos sais biliares é mais baixa. Faixas de pH e concentrações biliares em tempos variáveis são analisadas em testes *in vitro*, a fim de determinar a sobrevivência das cepas. Em geral, as bifidobactérias são menos tolerantes às condições ácidas que os lactobacilos, enquanto que o primeiro parece ser mais tolerante aos sais biliares. Poucos estudos foram realizados utilizando amostras de suco gástrico e bile humana

e, curiosamente, a fonte de bile (bovino, porcino ou humano) modifica o padrão de tolerância. Portanto, seria recomendável que as culturas probióticas destinados ao consumo humano fossem testadas na presença de fluidos intestinais humanos (LEE, 2009a).

Os lactobacilos e bifidobactérias produzem ácidos orgânicos como produtos finais do metabolismo de carboidratos. Desta forma, estes gêneros podem tolerar níveis de pH mais baixos do que muitas bactérias. Com efeito, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os organismos probióticos podem sobreviver ao trânsito gástrico enquanto as células são expostas a valores de pH tão baixos como 2,0, embora o tempo de exposição (1 a 2 horas) seja relativamente curto (KIMURA et al., 1997).

Outra abordagem para a busca de melhores cepas de probióticos está na adaptação de espécies selvagens para as condições de estresse do intestino. Após a ingestão, as bactérias probióticas devem sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal e alcançar o cólon, a fim de exercer seu efeito benéfico. O baixo pH do estômago e a elevada concentração de sais biliares no intestino delgado atuam como detergentes biológicos que rompem a membrana celular dos micro-organismos, o que representa o principal desafio do micro-organismo (LEE, 2009a).

O metabolismo do organismo probiótico é uma consideração importante para o desenvolvimento de alimentos probióticos fermentados, não somente no que diz respeito ao crescimento do probiótico e sua sobrevivência, mas também na forma como este influenciará na qualidade do alimento. Como exemplo estão os lactobacilos heterofermentativos que produzem CO₂ como produto final do seu metabolismo e que não serão adequados para aqueles alimentos em que a formação de gás venha a causar impactos negativos de qualidade. As bifidobactérias produzem acetato e lactato como produtos finais da fermentação de carboidratos e podem liberar um sabor característico de vinagre caso essas bactérias estejam ativas e continuem fermentando o produto. Os lactobacilos e bifidobactérias podem utilizar de uma vasta gama de fontes de carbono, dependendo da cepa e da espécie. A capacidade de utilizar como substrato carbono e nitrogênio disponíveis no alimento será necessária para o crescimento do probiótico e para as reações de fermentação (BOYLSTON et al., 2004).

Fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam na sobrevivência de micro-organismos probióticos adicionados ao alimento (Figura 1). É importante considerar estes fatores em todas as fases, ou seja, desde a adição do micro-organismo ao produto até sua chegada ao trato gastrintestinal. Para Lee (2009a), os principais fatores que influenciam na capacidade dos probióticos de sobreviver em produtos alimentares incluem:

- Estado fisiológico do probiótico adicionado.
- As condições físicas e químicas de processamento de alimentos.
- As condições de estocagem do produto (por exemplo, temperatura).
- A composição química do produto (acidez, nutrientes, umidade, oxigênio).
- Interações com outros componentes do produto (inibidores ou protetivos).

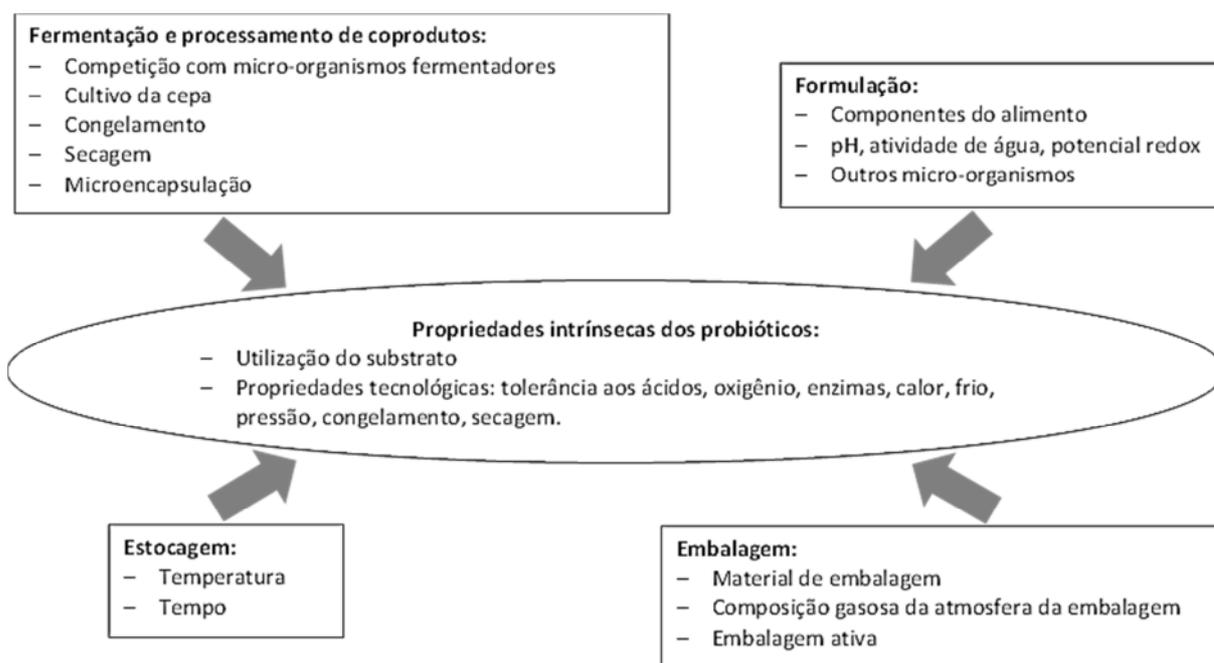


Figura 1. Fatores que afetam a viabilidade e estabilidade dos probióticos. Adaptado de Saarela (2007).

2.3 Consumo de produtos probióticos e saúde

As cepas bacterianas normalmente usadas como micro-organismos probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MADUREIRA et al., 2005).

O trato gastrointestinal humano é um nicho ecológico muito complexo e as bactérias que o habitam podem atingir maiores densidades celulares do que as registradas em qualquer outro ecossistema. No entanto, os lactobacilos e as bifidobactérias compreendem menos de 5% da microbiota intestinal total (LEE, 2009a).

Alguns benefícios à saúde atribuídos aos probióticos estão relacionados com a sua capacidade de aderir à mucosa intestinal. A adesão é um pré-requisito para a colonização intestinal, estimulação do sistema imunológico e para a atividade antagonista contra enteropatogênicos através de exclusão competitiva. O antagonismo entre micro-organismo no ambiente intestinal é exercido por competição por nutrientes e pela localização física, mas também através da produção de substâncias antimicrobianas. A capacidade dos probióticos de produzir substâncias antimicrobianas representa um mecanismo para inibir, excluir ou competir com enteropatogênicos aderidos no mesmo meio. Além disso, algumas culturas probióticas estão sendo estudadas como capazes de modular o sistema imunológico, produzir compostos antígenotóxicos, desconjugar sais biliares e para diminuir os níveis de colesterol (YOUSEF; JUNEJA, 2002).

Algumas propriedades funcionais dos micro-organismos probióticos são citadas a seguir:

- Capacidade de utilizar prebióticos para o crescimento.
- Capacidade de sintetizar vitaminas.
- Capacidade de inibir ou excluir patógenos.
- Resistência a antibióticos, o que permite que os probióticos sejam utilizados associados à administração de antibióticos para prevenção de diarreia.
- Capacidade de sintetizar β -galactosidase.
- Capacidade de desconjugar ácidos biliares.

- Capacidade de produzir substâncias antimicrobianas.
- Capacidade de modular reações imunológicas, como na prevenção e tratamento de gastroenterite aguda em humanos. Efeitos imunes dos probióticos também têm sido observados em estudos de câncer de cólon e de bexiga.

As bifidobactérias desempenham um papel significativo na redução do pH intestinal através da produção dos ácidos acético e láctico, restringindo, assim, o crescimento de muitas bactérias potencialmente patogênicas. O ácido acético tem valores de pKa mais elevados do que o ácido láctico (4,87 e 3,08 respectivamente) e, por conseguinte, tem uma maior proporção de ácido não dissociado em um determinado pH. Isso faz com que o ácido acético tenha maior poder inibitório que o ácido láctico no desenvolvimento de leveduras, bolores e bactérias. Além do efeito do pH, o ácido não dissociado colapsa o gradiente electroquímico dos prótons causando bacteriostase e consequente morte de bactérias (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2009).

A administração da bactéria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12[®]) não só modifica a composição da flora intestinal, mas também a sua atividade metabólica. Um aumento da concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta, uma diminuição do valor de pH e uma menor concentração de amoníaco, indóis e outras substâncias putrefativas foi observado nas fezes. Esta cultura também está sendo estudada por provocar um impacto inibitório sobre a tumorigênese, bem como sobre o metabolismo dos lipídeos. A administração de BB-12[®] tem sido associada com efeitos estimuladores não específicos sobre a produção de citocinas e atividade fagocitária, bem como as reações imunes mais específicas, tais como a produção de anticorpos. Efeitos imunomoduladores do BB-12[®], também foram observados em indivíduos com alergia, infecções respiratórias, ou com um sistema imunitário comprometido (FUKUSHIMA, 1997). Ao adicionar bifidobactérias em iogurte, uma redução significativa na contagem de *S. mutans* na saliva foi observada, o que sustenta a hipótese de que estas bactérias probióticas podem ser utilizadas na prevenção de cáries (ÇAGLAR et al., 2005).

A produção de ácidos orgânicos, particularmente dos ácidos láctico e acético, de bacteriocinas e até mesmo antibióticos, assim como a secreção de enzimas, vitaminas e outros fatores de crescimento pelas bifidobactérias são, em

conjunto com o estímulo ao sistema imunológico e a acúmulo de metabólitos específicos, os fatores determinantes da sua ação probiótica (BALLONGUE, 2004). Dentre algumas funções atribuídas às bifidobactérias estão:

- Adesão ao epitélio intestinal,
- Ação na morfologia e fisiologia da parede do sistema digestório,
- Efeitos nutricionais,
- Efeitos metabólicos (intolerância à lactose, hipercolesterolemia, desconjugação dos sais biliares, redução de nitrosaminas, inibição de redutores de nitrato),
- Efeito anti-infeccioso contra bactérias patogênicas,
- Efeitos terapêuticos (anticancerígeno, prevenção e tratamento de doenças como diarreia e constipação intestinal).

Afirma-se que níveis reduzidos de bactérias do gênero *Bifidobacterium* no intestino podem desencadear algumas doenças, incluindo o câncer de cólon, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória do intestino, ou doença celíaca. Por essa razão várias propriedades de promoção da saúde são atribuídas aos micro-organismos deste gênero e o aumento dos níveis de bifidobactérias no trato gastrointestinal é muitas vezes um alvo nas estratégias de intervenção na dieta (MARGOLLES, 2011).

2.4 Gênero *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* pertence ao filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Bifidobacteriales* e família *Bifidobacteriaceae*. Existem 29 espécies incluídas no gênero *Bifidobacterium*: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, e *B. thermophilum*. Por sua vez, 2 subespécies constituem as espécies *B. animalis* (subsp.

animalis e *lactis*), *B. pseudolongum* (subsp. *globosum* e *pseudolongum*), e *B. thermacidophilum* (subsp. *thermoacidophilum* e *porcinum*), e a espécie *B. longum* é subdividida em três diferentes biotipos (*longum*, *infantis* e *suis*) (LEE, 2009a).

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* apresentam forma bacilar, são Gram-positivas, sem motilidade e não esporuladas. São micro-organismos estritamente anaeróbicos (BALLONGUE, 2004). No entanto, algumas espécies, como *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium psychraerophilum*, podem tolerar concentrações de oxigênio moderadamente altas, e possuem metabolismo fermentativo (MARGOLLES, 2011).

O gênero *Bifidobacterium*, que muitas vezes foi considerado no mesmo contexto das genuínas bactérias lácticas e compartilhava algumas de suas características típicas, não está filogeneticamente relacionado e tem um único modo de fermentação de açúcar (CRITTENDEN, 2004).

As bifidobactérias foram descritas primeiramente no início do século XX e foram incluídas na família *Lactobacillaceae*. Em 1924, o *Lactobacillus bifidum* foi reclassificado com o novo gênero *Bifidobacterium* por Orla-Jensen (MARGOLLES, 2011).

As bifidobactérias são agrupadas de acordo com sua origem, ou seja, as que são isoladas apenas de animais e aquelas que colonizam as cavidades naturais dos seres humanos (CRITTENDEN, 2004). Entre as espécies mais comumente encontradas no trato gastrointestinal estão *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, e *B. dentium*. A espécie *B. animalis* é a mais frequentemente encontrada em alimentos funcionais (MASCO, 2005).

Apenas seis espécies de bifidobactéria (*Bifidobacterium adolescentis*, *breve*, *bifidum*, *infantis*, *lactis* e *longum*) têm atraído a atenção na indústria de laticínios, principalmente para a fabricação de produtos lácteos fermentados. Dentre elas a mais comumente empregada em alimentos é *B. animalis* subsp. *lactis*. Esta espécie é significativamente mais robusta do que as espécies intestinais humanas, tais como *B. longum* (*infantis*), *B. breve* e *B. bifidum* (TAMIME, 2002).

No que diz respeito à fisiologia das bactérias deste gênero, a temperatura ótima de crescimento da maioria das cepas isoladas de humanos está entre 36°C e 38°C. Em contrapartida, para a espécie de origem animal a temperatura é ligeiramente mais elevada, entre 41 e 43°C, podendo atingir 46,5°C. Não há crescimento abaixo de 20°C e acima de 46°C. O pH ótimo está entre 6,5 e 7,0 e não ocorre crescimento abaixo de pH 5,0 ou acima de 8,0 (BALLONGUE, 2004).

Diferentes espécies utilizam diferentes tipos de carboidratos na fermentação, na qual uma enzima chave está envolvida, a fosfoctolase frutose-6-fosfato (F-6-PPK). Este tipo de fermentação e a enzima F-6-PPK são usadas na identificação do gênero dessas bactérias. Deve-se notar que nem todas as espécies possuem F-6-PPK suficiente para que possa ser identificada (TAMIME, 2002).

As hexoses são degradadas exclusivamente pela via frutose-6-fosfato (F-6-PPK). A fermentação de dois moles de glicose origina três moles de acetato e dois moles de lactato. Na realidade, o ácido pirúvico pode ser catabolizado em duas vias: a primeira é a redução do piruvato para formar L (+)-lactato pela L(+)-dehidrogenase, uma enzima controlada pela frutose-1,6-difosfato (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

As proporções dos produtos finais de fermentação podem variar consideravelmente de uma cepa para outra e mesmo dentro de uma mesma espécie. Pequenas quantidades de ácido succínico são produzidas por algumas linhagens, e uma pequena quantidade de CO₂ pode ser produzida durante a degradação de gluconato (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Conforme descrito anteriormente, as bifidobactérias são micro-organismos estritamente anaeróbicos. No entanto, o grau de tolerância ao oxigênio depende da espécie e do meio de cultura (BALLONGUE, 2004). Entre as cepas capazes de se desenvolver na presença de oxigênio, algumas permanecem como catalase negativa, outras se tornam catalase positiva, e para outras a presença da catalase está ligada à presença de hemina no meio. Estudos da absorção de oxigênio de cinco cepas de *Bifidobacterium* de origem humana mostraram que a pressão parcial do oxigênio caiu pela metade durante as fases de multiplicação destas bactérias. A absorção endógena do oxigênio está relacionada à presença de NADH-oxidase. Isso

ocorre também na ausência de glicose e parece depender diretamente da quantidade de polissacarídeos acumulados na célula. Além disso, todas as cepas acumularam peróxido de hidrogênio, o qual foi subsequentemente reduzido pela NADH-peroxidase. No entanto, a atividade destas enzimas variou de acordo com a cepa analisada. As cepas mais sensíveis ao oxigênio tiveram uma atividade baixa da NADH-peroxidase, resultando na tóxica acumulação de peróxido de hidrogênio. Outra possibilidade seria a prevenção da multiplicação pela presença de oxigênio ativo e superóxido (BALLONGUE, 2004).

As taxas de oxigênio e o pH exercem as maiores influências na sobrevivência das bifidobactérias durante a estocagem dos alimentos probióticos. A viabilidade das bifidobactérias a valores ácidos de pH é muito variável, mas, em geral, pode-se considerar que a resistência dessas bactérias a pH ácido é fraca, com a exceção da *B. animalis* (MASCO, 2005). Esta espécie tolera de forma satisfatória a valores de pH ácido e também à concentrações moderadas de oxigênio, e, por estas razões, são as mais usadas em produtos fermentados probióticos. Isso indica que a tolerância à acidez das bifidobactérias está ligada à atividade da enzima F₀F₁-ATPase ligada à membrana celular e que é responsável pela manutenção da homeostase do pH intracelular em bactérias anaeróbias. A alta indução da atividade da F₀F₁-ATPase observada nesta espécie pode ser responsável por sua resistência à acidez, uma vez que esta atividade não é induzida em cepas não resistentes (MARGOLLES, 2011).

A sensibilidade da bifidobactérias ao oxigênio pode ser controlada pela seleção da cepa e através do emprego de técnicas e materiais de embalagem (MILLER, 2002). Ingredientes antioxidantes tais como glucose oxidase, ácido ascórbico ou cisteína mostram eficientes em melhorar a sobrevivência probiótico (CRUZ et al., 2012), bem como o uso de embalagem com barreira ao oxigênio ou a embalagem com atmosfera modificada (TALWALKAR et al., 2004).

A própria matriz alimentícia pode exercer função protetora aos probióticos. Um exemplo é o queijo, onde o ambiente anaeróbio, elevado teor de gordura e a capacidade de tamponamento da matriz ajuda a proteger as células probióticas tanto no produto quanto durante o trânsito intestinal (BOYLSTON et al., 2004).

A tolerância aos sais biliares é outra propriedade crucial para a permanência das bifidobactérias no trato gastrointestinal humano. Madureira et al. (2005) estudaram diversas cepas de *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* ssp. *paracasei* e *L. brevis* submetidas às condições que simulavam o trato gastrointestinal. Os autores relataram que os micro-organismos *Bifidobacterium animalis* BB-12[®] e *L. brevis* LMG 6906 exibiram a melhor viabilidade quando expostos aos sais biliares.

2.5 Queijos como carreadores de probióticos

Os primeiros relatos científicos sobre a incorporação de bactérias probióticas em queijos exploraram o uso das bifidobactérias. Considerações tecnológicas também favoreceram a adoção das bifidobactérias como probióticos. Estas bactérias produzem lactato e acetato durante a fermentação de açúcar, sem a formação de gases e, na maioria das espécies, sem comprometer a qualidade sensorial dos alimentos lácteos fermentados. Muitas espécies apresentam um bom crescimento usando lactose como fonte de carbono, e com isso, podem ser incorporadas aos alimentos lácteos fermentados, produtos estes tradicionalmente usados como carreadores de micro-organismos probióticos. A espécie *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* é consideravelmente mais tolerante à acidez, ao oxigênio e à temperatura do que a maioria das espécies de bifidobactérias de origem humana intestinal e, por isso, é tecnologicamente adequada para produtos lácteos fermentados (MARGOLLES, 2011).

Uma vez que as bifidobactérias são micro-organismos anaeróbios estritos e, em geral, menos tolerantes ao ácido do que os lactobacilos, a sua utilização em alimentos funcionais demanda maiores desafios tecnológicos. Os produtos lácteos fermentados ainda são os principais alimentos carreadores das bifidobactérias probióticas. Certo número de parâmetros, incluindo interações com outros micro-organismos, sais, açúcares e compostos aromatizantes e corantes, podem influenciar na sobrevivência das bifidobactérias nestes produtos. No entanto, o teor de oxigênio e o pH talvez exerçam a maior influência sobre a sobrevivência das bifidobactérias durante a estocagem dos produtos. A sensibilidade ao oxigênio pode

ser direcionada pela seleção da espécie de bifidobactéria e com técnicas apropriadas e uso de materiais de embalagem adequados. As *Bifidobacterium lactis* podem sobreviver bem em produtos lácteos fermentados durante todo o seu prazo de validade contanto que o pH do meio permaneça acima de 4,1 (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Embora a maior parte dos produtos desenvolvidos envolvendo probióticos seja baseada em leites fermentados, alguns exemplos podem ser observados no setor de queijos. Para explorar as propriedades funcionais das bactérias probióticas, os processos de fabricação de queijos devem ser modificados e adaptados às exigências desses micro-organismos. Quando isso não for possível, outras culturas probióticas podem ser aplicadas ou novos produtos poderão ser desenvolvidos. Os queijos frescos parecem ser ideais como carreador de bactérias probióticas. Uma das razões se deve ao fato do queijo fresco não passar pelo processo de maturação e sua estocagem realizada em temperatura de refrigeração. Além disso, sua vida útil é bastante curta, ou seja, o queijo fresco é um alimento de consumo rápido. O resfriamento é necessário para garantir taxas elevadas de sobrevivência dos probióticos e para se obter uma estabilidade suficiente do produto. Além disso, o teor de oxigênio, potencial redox e atividade de água do produto devem ser considerados, uma vez que o alvo de bactérias probióticas é o trato intestinal. Isto pode ser de grande importância para os queijos pré-embalados. O resfriamento do queijo probiótico é também necessário para reduzir ou inibir a interação de micro-organismos ativos com os componentes do alimento (HELLER et al., 2003).

Assim, o pH perto da neutralidade, a sua alta atividade de água, a sua matriz sólida, com uma concentração relativamente elevada de lipídios, são características do queijo fresco que podem auxiliar na manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos, bem como oferecer-lhes proteção durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (CRUZ et al., 2011). Outras características, como a baixa concentração de sal e a ausência de substâncias conservantes, observadas em alguns tipos de queijos, como o queijo Minas Frescal, oferecem excelentes condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas (BURITI et al., 2005a).

Em estudo realizado por Gardiner et al. (1999), a recuperação fecal das bactérias probióticas foi melhor quando o queijo foi utilizado como veículo em vez de iogurte. Em comparação com iogurtes, as desvantagens dos queijos, especialmente os semi-duros e duros, resulta do elevado teor de gordura e sal e relativamente baixa ingestão diária recomendada. Desse modo, a concentração de probióticos em queijo deve ser de aproximadamente quatro a cinco vezes mais elevada do que no iogurte. No entanto, esta consideração não se aplica aos queijos frescos, que podem ser facilmente reduzidos do teor de gordura e sal, e para os quais a ingestão diária recomendada é maior. O queijo fresco pode, portanto, servir como um alimento com um elevado potencial para ser usado como um carreador de micro-organismos probióticos.

Heller et al. (2003) afirmaram que o encaixe da bactéria probiótica na matriz lipoprotéica do queijo confere uma capacidade tamponante durante a passagem desse alimento probiótico pelo trato gastrintestinal, o que auxilia na sobrevivência dos micro-organismos. Assim, acredita-se que matriz dos queijos seja eficaz na proteção da bactéria probiótica contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares.

A atividade de água é uma questão fundamental para a sobrevivência dos probióticos. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), os queijos são classificados como mole/massa branca (umidade > 55%), macios (umidade entre 46 e 54,9%), queijos semi-duros (umidade entre 36 e 45,9%) e duros (umidade < 35,9%). O queijo Minas Frescal é classificado como um queijo de muito alta umidade. No que se refere à incorporação de probióticos em queijo durante a fabricação, isto ocorre geralmente em conjunto com a adição das culturas *starters*. Em alguns casos, as bactérias probióticas podem ser adicionadas depois que o soro de leite é drenado a fim de não perder células probióticas nesta etapa do processo (VINDEROLA, BURNS, RENHEIMER, 2011).

Vinderola et al. (2000) demonstraram a tolerância ao pH 3 em uma solução de ácido clorídrico das cepas *B. longum*, *B. infantis*, *Lb. acidophilus* e *Lb. casei* incorporadas em queijos frescos argentinos. Fritzen-Freire et al. (2010a) concluíram que o queijo Minas Frescal produzido por acidificação direta com ácido láctico

mostrou um grande potencial como alimento funcional, com possível aplicação industrial e comercialização.

2.6 Sistema de embalagem com atmosfera modificada e a vácuo

O sistema de embalagem com atmosfera modificada (AM) consiste da alteração da atmosfera de uma câmara ou embalagem através da injeção de gases como CO₂, N₂ e/ou O₂ (JAY, 2000).

A embalagem a vácuo foi a primeira forma de modificação da atmosfera do interior da embalagem desenvolvida comercialmente, sendo amplamente empregada para produtos como cortes de carnes vermelhas frescas, queijos duros e café torrado e moído (PARRY, 1993). Um sistema de embalagem a vácuo pode ser alcançado acondicionando o alimento em um material plástico flexível de alta barreira aos gases em que se aplica o vácuo e realiza-se a termoselagem. Este procedimento tem o objetivo de reduzir a pressão gasosa residual de $1,0 \times 10^5$ para $3,0 \times 10^4$ Pascal e então, grande parte do oxigênio é removido (pressão final de aproximadamente 0,03 atm). Quando produtos alimentícios são acondicionados a vácuo, ocorre o aumento do volume de gás carbônico como resultado da respiração celular e microbiana em que o oxigênio residual é consumido e o gás carbônico é liberado na mesma proporção (JAY, 2000).

Na embalagem a vácuo o ar é removido para prevenir o crescimento de organismos deteriorantes, a oxidação e a descoloração do produto. Sob estas condições, o oxigênio residual é utilizado pela microbiota aeróbica residente produzindo gás carbônico e fazendo com que o potencial de redox tenda a ficar negativo. Esta mudança no potencial redox e na composição da atmosfera suprime o crescimento de bactérias aeróbias deteriorantes que produzem a viscosidade, rancificação e descoloração indesejáveis no produto. A condição resultante favorece o crescimento de organismos anaeróbios facultativos incluindo as bactérias ácido-láticas, porém em velocidade lenta (GENIGEORGIS, 1985).

Na embalagem com atmosfera modificada (AM) são usadas combinações de misturas gasosas contendo CO₂, N₂ e O₂. Em produtos frescos a escolha da

mistura de gás é influenciada pela microflora capaz de crescer no produto, pela sensibilidade do produto ao oxigênio e ao CO₂, e pela estabilidade da cor desejada (CHURCH, 1994). Estes sistemas utilizam filmes com barreira ao oxigênio e quase sempre estas embalagens são mantidas durante a estocagem e distribuição sob temperatura de refrigeração. A atmosfera de gás inserida nas embalagens se altera continuamente durante todo o período de estocagem devido à influência de diversos fatores, como a respiração do produto acondicionado, mudanças bioquímicas e a lenta difusão dos gases através do alimento (PARRY, 1993).

O nitrogênio é um gás quimicamente inerte, insípido e menos predisposto a acidentes durante a manipulação do que os outros gases comumente usados na AM. O N₂ é usado como um gás de enchimento, substituindo ar atmosférico, retardando assim, a rancificação oxidativa e inibindo o crescimento de microorganismos aeróbios. Pode ser usado como uma alternativa para a embalagem a vácuo quando o produto é frágil, ou para limitar o colapso da embalagem causado pela absorção do CO₂ pelo produto (CHURCH, 1994; CHURCH, 1995). Neste caso, a permeabilidade ao nitrogênio do material de embalagem deve ser compatível com a vida útil desejada para o produto.

O CO₂ é um inibidor do crescimento bacteriano e de fungos. A solubilidade deste gás é maior em temperaturas mais baixas, logo, a temperatura de estocagem refrigerada possui um efeito sinérgico para a ação bacteriostática do gás carbônico (CHURCH, 1995). Os bolores, leveduras e bactérias aeróbias deteriorantes são altamente susceptíveis ao gás carbônico. As bactérias anaeróbias facultativas podem ou não serem inibidas pelo gás carbônico, enquanto as bactérias ácido-láticas e anaeróbias são altamente resistentes (FINNE, 1982). Em geral, as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis à inibição pelo CO₂ do que as Gram-positivas, sendo as *Pseudomonas* classificadas como as mais sensíveis, e os clostrídios, como os mais resistentes (JAY, 2005).

O primeiro mecanismo de ação de CO₂ é o deslocamento parcial ou total do oxigênio disponível para o metabolismo aeróbio microbiano, diminuindo assim o crescimento das bactérias. Embora a redução de oxigênio disponível possa ter algum efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, ele não é o fator limitante (DANIELS et al., 1985). Como o CO₂ é mais solúvel que o oxigênio, ele facilmente

desloca o oxigênio minimizando diversas reações de degradação. O efeito antimicrobiano do CO₂ depende de vários fatores, incluindo a pressão parcial, o tempo de aplicação, a concentração de CO₂, temperatura do meio, o volume de gás no espaço livre, a acidez, a atividade de água do meio, o tipo de micro-organismo presente, o tipo de alimento, a fase de crescimento microbiano e a temperatura de estocagem (HOTCHKISS; BANCO, 1992). A atividade antimicrobiana da molécula de CO₂ é provavelmente devido à inibição da descarboxilação enzimática e acumulação de CO₂ nas bicamadas lipídicas da membrana celular causando disfunção da permeabilidade da membrana. Como o CO₂ pode inibir eficazmente o crescimento de muitos micro-organismos deterioradores de alimentos, especialmente as bactérias Gram-negativas, este gás tem sido comercialmente aplicado a muitos produtos refrigerados em embalagem com atmosfera modificada (BOLDUC et al., 2006). De acordo com Gill e Tan (1980), os lactobacilos são muito resistentes ao CO₂ e podem tolerar e crescer na atmosfera de 100% CO₂. As bactérias provocadoras de intoxicações alimentares, como os clostrídios, não são afetadas pela alta concentração de CO₂ e as bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Y. enterocolitica* e *L. monocytogenes*, são pouco afetadas (HINTLIAN, HOTCHKISS; 1986).

O efeito do CO₂ sobre o crescimento das bifidobactérias foi testado, tanto no isolamento, quanto na caracterização de várias espécies. Para a maioria das espécies, o CO₂ não afeta o crescimento anaeróbio em cultura *stab* (tubo contendo um meio de cultura semi-sólido); exceções incluem *B. angulatum* e *B. asteroides*, nos quais o crescimento foi altamente estimulado. Algumas espécies de *Bifidobacterium*, tais como *B. indicum*, *B. asteroides*, *B. globosum*, *B. boum*, e *B. thermophilum*, cresceram em cultura *stab* na presença de ar enriquecido com 10% de CO₂ (KAWASAKI, et al. 2007). Embora o CO₂ seja convencionalmente usado na cultura das bifidobactérias, ainda é essencialmente desconhecida necessidade e o efeito de diferentes concentrações deste gás sobre o crescimento das espécies *Bifidobacterium*, tanto em condições de anoxia e quanto na presença de oxigênio.

A mistura de gases tipicamente utilizada na embalagem de queijos é de 70% de N₂ : 30% de CO₂. Alves et al. (1996) compararam as atmosferas 100% N₂, 100% CO₂ e 50% N₂ : 50% CO₂ em fatias de queijo muçarela acondicionado em

filmes laminados de alta barreira. Os autores relataram que as atmosferas compostas por 100% e 50% de CO₂ foram mais eficazes em prolongar a vida de prateleira das fatias de queijo muçarela. De acordo com o trabalho realizado por Araújo et al. (2005) os tratamentos com atmosfera modificada tanto a 70% de CO₂ como a 100% de CO₂ prolongaram a vida-de-prateleira do queijo Minas Frescal para 20 dias a 7°C; e de forma geral, a embalagem com atmosfera modificada com 70% de CO₂ e 30% de N₂ foi a mais eficiente.

Tanto o material de embalagem, como a carga microbiana inicial, o histórico de temperatura e a composição do produto podem determinar a eficácia da conservação pela AM. A barreira do material de embalagem é o principal meio de manter a concentração original de CO₂ aplicada. Materiais de embalagem com boa barreira ao oxigênio, como o policloreto de vinilideno (PVdC), o copolímero de etileno com álcool vinílico (EVOH) e as poliamidas (Nylon) são mais efetivos que o polietileno de baixa densidade (PEBD) e o poliestireno (PS) na manutenção da viabilidade das bifidobactérias de queijos (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993). Embalagens ativas com barreira ao oxigênio ou filmes com permeabilidade seletiva tem potencial aplicação futura na embalagem de produtos probióticos (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Materiais flexíveis de multicamadas contendo Nylon são usados principalmente em embalagem a vácuo para alimentos como queijo, bacon, mortadelas, salsichas e outras carnes processadas. O Nylon é um tipo de poliamida que apresenta excelente termoformabilidade, resistência à abrasão, ao impacto e ao rasgamento. Também apresenta boa barreira aos gases, gordura e aromas. Este tipo de polímero é utilizado em AM com CO₂ para aves, peixes e carne fresca. Os Nylons são usados em processos de co-extrusão com outros materiais plásticos como as poliolefinas, especialmente PEBD e o copolímero de etileno com acetato de vinila (EVA). O processo de co-extrusão proporciona resistência e tenacidade pela junção eficaz de diferentes materiais, associando as propriedades de cada um deles para proporcionar boa capacidade de termosselagem e melhor barreira à umidade (HERNANDEZ, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Processamento do Queijo Minas Frescal Probiótico

Para este estudo foram realizados três processamentos do queijo Minas Frescal probiótico no Laticínio-Escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), localizada na cidade de Pirassununga/SP. O leite bovino utilizado era proveniente de um mesmo rebanho, ordenhado no dia do processamento dos queijos e pasteurizado no mesmo local de produção.

Foi empregada a cultura probiótica liofilizada *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12[®], CHR Hansen, Dinamarca) na forma DVS (*direct set vat*), previamente reativada em leite estéril.

A Figura 2 apresenta o fluxograma de processamento do queijo Minas Frescal probiótico. O leite integral foi pasteurizado (75°C / 15 segundos) e resfriado até 40°C. A adição dos ingredientes foi realizada em constante agitação, obedecendo a seguinte sequência: 20 g/L de cloreto de sódio, 0,50 mL/L solução 50% de cloreto de cálcio (correspondente a 0,25 g/L de CaCl₂), 0,125 g/L cultura probiótica BB-12[®] (previamente reativada em 2 litros de leite estéril resfriado até 40°C), 0,25 mL/L ácido láctico 85% previamente diluído em água (1:10) e 1,50 mL/L de coalho líquido (enzima quimosina, Estrella[®], CHR Hansen, Dinamarca). Passado 1 minuto após a adição do coalho, a agitação foi interrompida para a coagulação do leite por aproximadamente 40 minutos. O coágulo formado foi cortado em cubos de aproximadamente 2 cm³ e agitado vagarosamente em intervalos de 3 minutos (entre a agitação e a pausa) por 3 vezes, para dessoragem e contração. A massa foi então vertida em formas de 500 g e os queijos foram mantidos em câmara fria a 5±1°C. Foram realizadas viragens após 30, 60 e 240 minutos. Após 24 horas em refrigeração os queijos foram acondicionados com a utilização do equipamento de embalagem Selovac (modelo 200S, São Paulo, Brasil) conforme os seguintes tratamentos:

- Tratamento 1 (Controle): Embalagem de PEBD sob ar atmosférico.
- Tratamento 2: Embalagem flexível de Nylon/PEBD em atmosfera composta de 100% CO₂.
- Tratamento 3: Embalagem flexível de Nylon/PEBD em atmosfera composta de 100% N₂.
- Tratamento 4: Embalagem flexível de Nylon/PEBD em atmosfera com mistura gasosa de 50% CO₂ / 50% N₂.
- Tratamento 5: Embalagem flexível de Nylon/PEBD sob vácuo.

Os queijos acondicionados foram estocados a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 21 dias para a avaliação da estabilidade.

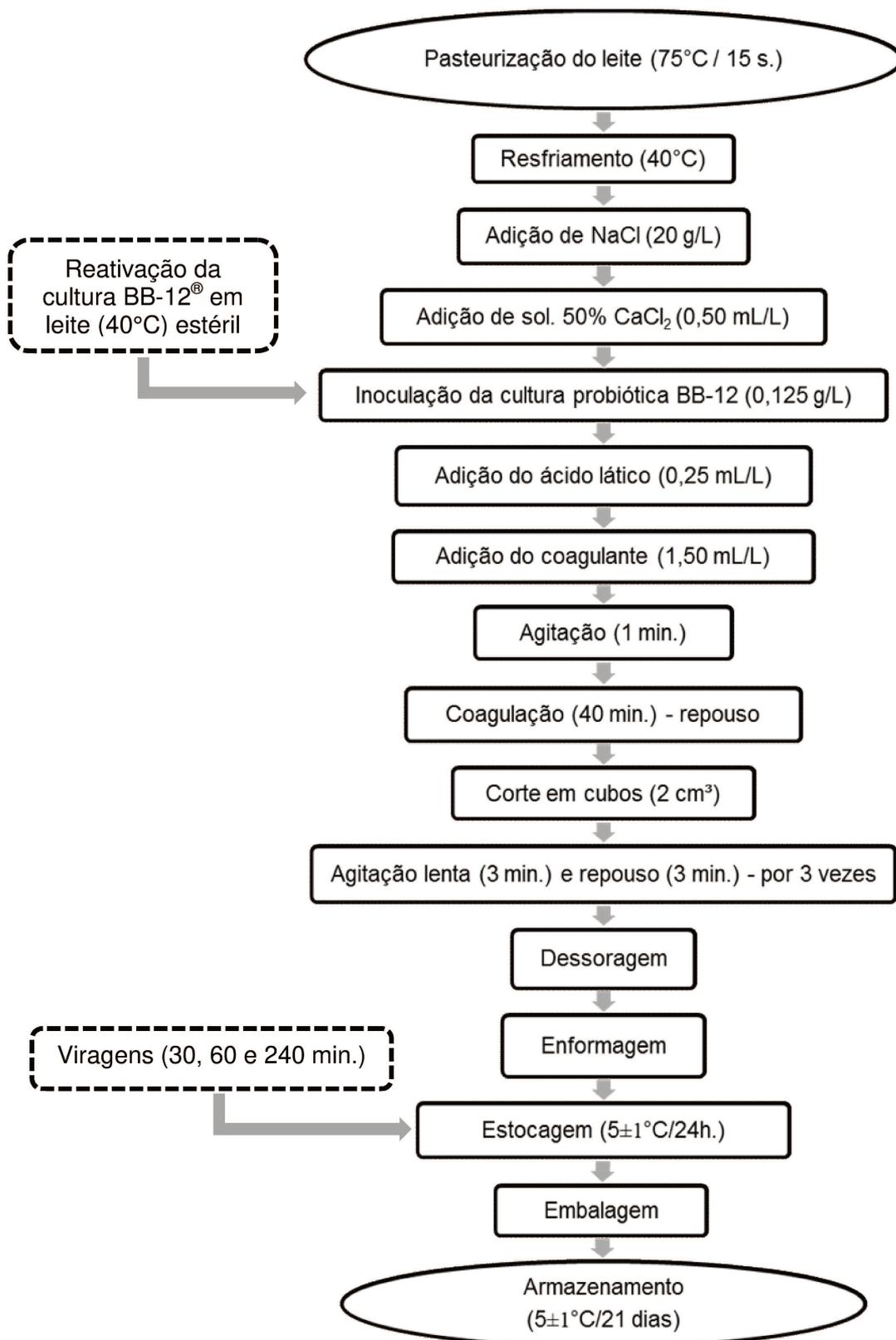


Figura 2. Fluxograma de produção do Queijo Minas Frescal probiótico.

3.2 Análises físico-químicas e microbiológicas de caracterização e avaliação da estabilidade

Em cada um dos três processamentos o leite pasteurizado foi analisado quanto ao pH, acidez titulável e coliformes totais e termotolerantes (45°C).

O padrão microbiológico dos queijos foi realizado após o processamento (24 horas de estocagem refrigerada) conforme exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), sendo: contagem de coliformes a 30 - 35°C e a 45°C através do método do número mais provável (NMP), Estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.*, segundo metodologia descrita por DOWNES e ITO (2001).

A caracterização do Queijo Minas Frescal probiótico foi realizada através das análises de pH, acidez titulável, umidade, gordura e proteína total.

Para o estudo da estabilidade do queijo foram realizadas as análises de pH, acidez titulável, umidade, proteólise, reologia (Perfil de Textura, *Creep Test* e Compressão Uniaxial), quantificação dos compostos metabólicos (ácidos acético, láctico e cítrico), contagem seletiva de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®], avaliação da viabilidade da *Bifidobacterium* BB-12[®] às condições do trato gastrointestinal. Todas as análises foram realizadas nos intervalos de 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem.

Uma amostra comercial de queijo Minas Frescal probiótico, contendo *Bifidobacterium lactis* Bi-07[™], acondicionado em embalagem a vácuo e com 16 dias de estocagem refrigerada foi caracterizada e usada como comparação nas avaliações reológicas e sensoriais.

3.2.1 Determinação do pH

As análises foram realizadas em triplicata utilizando o potenciômetro (modelo DM-20, marca Digimed, Brasil) a 25 ± 2 °C.

3.2.2 Acidez Titulável

A acidez titulável foi realizada em triplicata por titulação com solução de NaOH 0,1N, tendo como indicador fenolftaleína, expressa em % de ácido láctico, de acordo com a metodologia AOAC (2006).

3.2.3 Umidade

A determinação da umidade foi realizada em triplicata por secagem em estufa a 105°C por 16h, expressa em % de base úmida, segundo a metodologia AOAC (2006).

3.2.4 Gordura Total

Para determinação do teor de gordura presente nas amostras utilizou-se o método de Gerber, em triplicata, de acordo com a metodologia AOAC (2006).

3.2.5 Proteína Total

O teor de proteína total foi obtido pela multiplicação do valor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38. A análise foi realizada em triplicata utilizando o método oficial de Kjeldahl, de acordo com a metodologia AOAC (2006).

3.2.6 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi realizada em triplicata baseando-se na metodologia de MASUDA, YAMANARI e ITOH (2005). Uma porção de 3 g do queijo foi misturada a 27 mL de água destilada até se obter uma mistura homogênea. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 10°C (centrífuga Beckman Coulter, Inc., modelo Allegra® 64R, USA). Foram retirados 9 mL do sobrenadante e

misturados em 3 mL de solução 40% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA - Synth, Brasil). Essa nova mistura foi novamente centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Foi retirada uma alíquota de 0,15 mL do sobrenadante e acrescentados 3 mL da solução reagente de o-ftaldialdeído (OPA) (Sigma-Aldrich, EUA). A mistura foi submetida à leitura de absorvância a 340 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter, Inc., modelo DU-70 Fullerton, USA). A relativa atividade proteolítica foi expressa como absorvância dos grupos de aminoácidos livres, usando a solução TCA como branco para calibrar o espectrofotômetro.

O preparo do reagente OPA consistiu na pesagem, diretamente em um balão volumétrico de 50 mL, de 0,9 g de tetraborato de sódio e 0,5 g de dodecil sulfato de sódio. Adicionou-se, aproximadamente, 35 mL de água deionizada e solubilizou-se a mistura em banho de ultrassom por 30 minutos. Em um béquer pesou-se 40 mg de OPA e solubilizou-se com 1 mL de metanol P.A.. A mistura foi transferida para o balão volumétrico onde estava a solução de tetraborato de sódio e dodecilsulfato de sódio. Adicionou-se 100 µL de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e completou-se o volume utilizando água deionizada (CHURCH et al., 1983). Todo procedimento foi realizado ao abrigo da luz e a solução foi acondicionada em frasco de vidro âmbar e mantida em refrigeração até o momento do uso.

3.2.7 Determinação de ácidos orgânicos

O preparo das amostras consistiu na pesagem de 10 g do queijo Minas Frescal probiótico em balões volumétricos de 50 mL. Foram adicionados ao balão 140 µL de solução 15,5 N de ácido nítrico e o volume foi completado com uma solução 0,009 N de ácido sulfúrico. A mistura resultante foi transferida para tubos de ensaio e homogeneizada em vortex (Vortex Mixer, Labnet International, USA) por 1,5 minutos e colocada em banho-maria (SOC Fabbe LTDA, Brasil) a 50°C por 1 hora. Em seguida, a mistura foi então centrifugada (centrífuga Beckman Coulter, Inc., modelo Allegra® 64R, USA) a 4.000 g por 20 minutos a 4°C. A fração solúvel localizada entre a primeira camada (gordura) e o precipitado (caseína) foi novamente centrifugada a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,23 µm de poro (Millipore, Brasil), transferidos para frascos tipo Eppendorf e

mantidos congelados até o momento da análise (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006). A extração foi realizada em triplicata de amostra.

A quantificação dos ácidos acético, láctico e cítrico, foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando o método descrito por Marsili, Ostapenko e Green (1981) com ajustes. A análise foi desenvolvida utilizando um sistema modular Shimadzu LC-10 (Columbia, USA) composto de uma bomba LC-10AT VP, um forno de coluna CTO-10AS VP, um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A VP, uma interface SCL-10A e software Class VP Workstation. Uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) (BioRad, USA) foi utilizada com temperatura de forno de 35°C. O DAD foi operado entre 200 e 800 nm. Os cromatogramas para a análise quantitativa foram extraídos a 210 nm. As amostras foram analisadas no modo isocrático, com fase móvel 0,008 N de ácido sulfúrico, fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Os ácidos orgânicos foram quantificados através do método do padrão externo. Foram utilizadas soluções padrões de concentrações conhecidas de ácido acético e ácido láctico (100, 80, 60, 40, 20 e 10 µg/mL) e ácido cítrico (200, 180, 160, 140, 120 e 100 µg/mL) injetadas em triplicata. A concentração dos ácidos orgânicos foi calculada para cada tratamento pela interpolação das áreas dos picos obtidas em comparação com as obtidas com as soluções padrão. As concentrações foram expressas em miligrama de cada ácido orgânico por grama de queijo. Os picos dos ácidos orgânicos foram identificados pelos tempos de retenção (RT) e confirmados pela comparação do espectro UV com os padrões de referência.

3.2.8 Análises reológicas

Para a avaliação do comportamento reológico do queijo Minas Frescal probiótico e da amostra comercial, foram realizadas as análises de TPA (*Texture Profile Analysis*), Compressão Uniaxial e *Creep* utilizando o texturômetro TAXT2 (Stable Micro Systems Ltd, Reino Unido). O equipamento foi ajustado com célula de carga de 50 kg e operado pelo programa *Texture Expert* (Stable Micro Systems Ltd.). As amostras foram preparadas retirando-se cilindros de 20 mm de diâmetro por 24 mm de altura, desprezando-se as regiões do centro e as bordas do queijo. Os

cilindros foram mantidos a 10°C durante 90 minutos para posterior análise. Todas as determinações foram realizadas em sextuplicatas.

Análise de Perfil de Textura

A análise do perfil de textura foi realizada conforme metodologia descrita por Santos et al. (2015). Os ensaios foram realizados mediante a aplicação de dois ciclos consecutivos de compressão da amostra a 30% de sua altura inicial com uma sonda de 30 mm de diâmetro a uma velocidade axial constante de 1 mm/s. Os dados foram coletados, e as curvas de perfil de textura foram desenhadas usando o programa *Texture Expert*. Os seguintes parâmetros de textura foram calculados: dureza (*hardness*), adesividade (*adhesiveness*), elasticidade (*springness*), coesividade (*cohesiveness*), gomosidade (*gumminess*), mastigabilidade (*chewiness*) e resiliência (*resilience*). Para cada tratamento, 6 partes das amostras foram usadas na análise de textura instrumental.

Compressão uniaxial

A análise de compressão uniaxial foi realizada comprimindo a amostra até 20% de sua altura inicial, com uma velocidade de compressão axial constante e igual a 1 mm/s (DANTAS et al., 2015; MAGENIS et al., 2014; FRITZEN-FREIRE et al., 2010b).

Os dados brutos de força e deslocamento foram convertidos em tensão verdadeira (*true stress*, σ_t) e deformação verdadeira (*true strain*, ε_t), os quais podem ser calculados pelas Eq. 1 e 2, respectivamente (FELICIO et al., 2016).

$$\sigma_t = \frac{F(t)}{A(t)} = \frac{F(t)H(t)}{A_0H_0} \quad (1)$$

$$\varepsilon_t = \left| \ln \left(\frac{H(t)}{H_0} \right) \right| = \left| \ln \left(\frac{H_0 - \Delta H}{H_0} \right) \right| \quad (2)$$

Onde $F(t)$, $A(t)$ e $H(t)$ representam a força aplicada, a área de seção transversal e o deslocamento da altura da amostra em função do tempo, respectivamente; A_0 e H_0 correspondem à área transversal inicial e à altura inicial da amostra, respectivamente; e ΔH é a deformação absoluta.

A partir da curva de tensão-deformação (σ_t - ε_t) os seguintes parâmetros de compressão uniaxial foram estimados: módulo de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), deformação de ruptura (ε_{rup}) e trabalho de ruptura (W_{rup}). O ponto de ruptura corresponde ao primeiro ponto máximo local da curva σ_t - ε_t , onde os valores de σ_{rup} , e ε_{rup} são obtidos. O módulo de elasticidade (E) foi determinado como o coeficiente linear da parte inicial da curva, quando esta apresenta comportamento linear. O trabalho de ruptura (W_{rup}) corresponde à área sob a curva σ_t - ε_t até o ponto de ruptura (FELICIO et al., 2016).

Creep

A análise de *Creep* avalia o comportamento reológico de um material submetido a uma tensão constante, sem haver ruptura, e monitorando a deformação em função do tempo. A análise foi realizada aplicando-se à amostra uma força axial de compressão constante igual a 0,50 N durante 180 segundos (DANTAS et al., 2015; OLIVARES et al., 2009). Após esse tempo, a força foi retirada e a recuperação da amostra foi medida por mais 180 segundos. Os resultados foram expressos como a razão entre a deformação medida e a tensão inicial aplicada, denominado de compliância ($J(t) = \gamma(t) / \sigma_0$). As curvas de *Creep* (compliância (Pa^{-1}) \times tempo (s)) foram ajustadas ao modelo de Burgers de quatro-componentes expresso na Eq. 3 (BURGERS, 1935):

$$J(t) = J_0 + J_1(1 - e^{-t/\tau}) + \frac{t}{\eta_N} \quad (3)$$

Onde $J(t)$ é a compliância em função do tempo t ; J_0 é a compliância instantânea da mola do modelo de Maxwell; J_1 é a compliância viscoelástica que representa a compliância de retardado relacionada com o elemento de Kelvin-Voigt; τ é o tempo

de retardamento associado ao elemento de Kelvin-Voigt; e η_N é a viscosidade Newtoniana associada ao amortecedor do modelo de Maxwell.

3.2.9 Contagem seletiva da cultura probiótica

A contagem de micro-organismos viáveis foi realizada em duplicata nos períodos 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem refrigerada do queijo Minas Frescal probiótico. O meio seletivo foi preparado utilizando MRS-ágar (Difco, EUA) com adição de 100 mL de solução de glicose a 20% (p/v), 5 mL de solução de dicloxacilina (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,01% (p/v), 10 mL de solução de cloreto de lítio a 11,11% (p/v) e 5 mL de solução de cloreto de cisteína a 10% (p/v) para cada 1000 mL de meio de cultura (MAGANHA et al., 2013).

Para a contagem seletiva da cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®] uma amostra de 25 g de queijo foi homogeneizada em sacos plásticos tipo Stomacher 400 (Seward Co., Reino Unido) com 225 mL de solução de citrato de sódio a 2% (p/v) por 3 minutos e submetida a diluições sucessivas em água peptonada (Merck, Alemanha) a 0,1% (p/v). O plaqueamento foi realizado em profundidade, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (BD, EUA) a 37°C por 72 horas.

3.2.10 Viabilidade às condições do trato gastrointestinal

O preparo do suco gástrico artificial (SGA) foi realizado segundo Mozzi et al. (2009) e Picot e Lacroix (2004) com modificações, utilizando cloreto de potássio (1,12 g/L), cloreto de sódio (2,0 g/L), cloreto de cálcio (0,11 g/L) e fosfato de potássio monobásico (0,4 g/L), sendo esterilizado a 121°C/15 minutos. Imediatamente antes da sua utilização, o SGA foi adicionado de mucina tipo III - M1778 (3,5 g/L) (Sigma-Aldrich, EUA) e pepsina (0,26 g/L) (Sigma-Aldrich, EUA) e o pH foi ajustado entre 1,4 a 1,9 com HCl 1N.

A viabilidade das bifidobactérias às condições que simulam o trato gastrointestinal foi realizada seguindo a metodologia de Liserre, Ré e Franco (2007) com modificações. Uma amostra de 25 g de queijo foi homogeneizada em sacos plásticos tipo Stomacher com 225 mL de solução de SGA por 3 minutos. Uma alíquota de 100 mL da solução (SGA + amostra) foi transferida para um erlenmeyer fechado e incubada a 37 °C, sob agitação em banho metabólico tipo Dubnoff. Partindo dessa solução, foram realizadas diluições sucessivas e plaqueamentos nos tempos 0, 60 e 120 minutos de exposição ao SGA. Transcorridos 120 minutos, o pH da solução foi ajustado entre 4,3 a 5,2 com adição de NaHCO₃ (1 N) e foram adicionados bile bovina B3883 (10 g/L) (Sigma-Aldrich, EUA) e pancreatina P1625 (1,95 g/L) (Sigma-Aldrich, EUA). Um quarto plaqueamento foi realizado após 2 horas. Neste momento, o pH da solução foi ajustado para 6,7 a 7,5 e o quinto plaqueamento foi realizado após 2 horas nesta faixa de pH, totalizando 360 minutos de simulação às condições do trato gastrointestinal.

3.3 Avaliação Sensorial

Previamente à avaliação sensorial, os queijos foram analisados quanto ao padrão microbiológico estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001) e mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (ANEXO 1). Os testes foram realizados no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-UNICAMP (Campinas, SP, Brasil), que conta com cabines individuais e controle de iluminação e temperatura.

Foram consultados 105 consumidores, dentre os quais 56 % eram mulheres, 44 % homens e 74 % apresentavam faixa etária de 20 a 30 anos. Um questionário foi aplicado para o levantamento do perfil dos consumidores (ANEXO 3). Para a avaliação sensorial foram realizados os seguintes testes:

- Para o queijo Minas Frescal probiótico: teste de aceitação com escala hedônica (atributos: aparência, aroma, sabor, textura e impressão global), escala do ideal (gosto ácido e textura) e intenção de compra.

- Para o produto embalado: teste de aceitação com escala hedônica (análise visual do conjunto queijo + sistema de embalagem) e intenção de compra.

As análises foram realizadas após 21 dias de estocagem refrigerada. Uma amostra comercial de queijo Minas Frescal probiótico também foi avaliada a fim de compará-la aos demais tratamentos.

As amostras (≈ 15 g) foram apresentadas monadicamente em copos plásticos descartáveis codificados com números aleatórios de três dígitos. As amostras permaneceram estocadas sob refrigeração (5 ± 1 °C) até o momento do teste.

Foram realizados testes de aceitação utilizando escala hedônica e escala do ideal, ambas numéricas e estruturadas de 9 pontos (MEILGAARD et al., 1999). Para a avaliação da intenção de compra foi utilizada uma escala de 5 pontos. As fichas dos testes estão apresentadas no ANEXO 2.

Os efeitos *first-order-carry-over* foram balanceados através de delineamento publicado por Mac Fie et al. (1989).

3.4 Caracterização do Sistema de Embalagem

Após a termosselagem, todas as amostras passaram por inspeção visual da área de fechamento para verificar possíveis falhas.

As amostras foram submetidas à análise de composição gasosa do espaço livre da embalagem para medida da porcentagem (%) de CO₂ e O₂ antes da abertura das mesmas nos intervalos de 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem refrigerada.

As concentrações dos gases CO₂ e O₂ no espaço livre foram determinadas com o uso de um analisador de gás PacCheck™ 650 Dual Head Space Analyser (Modern Company Inc. – MOCON, EUA).

A taxa de permeabilidade ao oxigênio do material de embalagem foi avaliada através do método coulométrico com uso do aparelho de transmissão de

oxigênio do tipo OX-TRAN Oxygen Permeability modelo 2/61 MJ (Modern Company Inc. – MOCON, EUA), através da metodologia ASTM F1307-02.

A espessura da embalagem foi medida com micrômetro (modelo 543-782, Mitutoyo ABSOLUTE, Japão), de acordo com a metodologia ASTM D6988-13.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foram realizados 3 processamentos experimentais de queijo Minas Frescal probiótico utilizando os mesmos parâmetros de processo e metodologias de análise.

Para a análise estatística foi usado o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com no mínimo 3 repetições. O experimento foi montado em esquema fatorial 5 x 4. Os efeitos do tipo de queijo (5 níveis de variação: tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5), do tempo de estocagem (4 níveis de variação: 1, 7, 14 e 21 dias) e da interação destes fatores, foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) com teste F a 5% de probabilidade, sendo as médias comparadas com teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

A análise estatística dos resultados da avaliação sensorial foi realizada por análise de variância (ANOVA), sendo as diferenças avaliadas pelo teste de Tukey de comparações de médias ao nível de 5% significância.

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Statistica for Windows (versão 7.00) e o Assisat 7.5 beta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química e microbiológica do leite e do queijo Minas Frescal

A Tabela 1 apresenta os resultados médios das análises físico-químicas realizadas no leite cru e pasteurizado durante os processamentos do queijo Minas Frescal probiótico.

Observa-se que os resultados médios de acidez do leite cru e tratado termicamente apresentaram-se de acordo com o que preconiza a Instrução Normativa nº 62 que abrange o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru e do Leite Pasteurizado (BRASIL, 2011).

Conforme a Instrução Normativa nº 4 (BRASIL, 2004), que altera o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997), o queijo Minas Frescal se enquadra na classificação de queijo semi-gordo (25 e 44,99% de gordura) e de muito alta umidade (maior que 55%). Diante desses critérios, pode-se notar na Tabela 1 que, a média dos três processos resultou em um queijo magro (< 25%) e com teor de umidade correspondente ao estabelecido na legislação para o queijo do tipo Minas Frescal.

Tabela 1. Composição físico-química e contagem do *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] no queijo Minas Frescal probiótico após 1 dia de estocagem a 5±1°C e da amostra comercial.

Constituintes	Leite Cru	Leite Pasteurizado	Queijo Minas Frescal Probiótico	Amostra comercial
pH	6,71 ± 0,02	6,72 ± 0,03	6,30 ± 0,11	4,85 ± 0,01
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,67 ± 0,01
Umidade (%)	-	-	60,41 ± 2,88	64,52 ± 0,03
Gordura (%)	-	-	23,00 ± 3,25	64,52 ± 0,03
Proteína total (%)	-	-	19,25 ± 1,65	-
<i>Bifidobacterium</i> BB-12 [®] (UFC/g)	-	-	4,74 ± 1,95 x 10 ⁶	1,76 ± 0,55 x 10 ⁹

Média ± desvio padrão, n = 3.

Em relação à contagem inicial da *Bifidobacterium* BB-12[®], o queijo Minas Frescal com um dia de estocagem atende ao estabelecido pela legislação brasileira de alimentos probióticos quando consumido uma porção de 100 gramas. A legislação brasileira em vigor determina que a quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos na recomendação diária do produto deve estar entre 10⁸ e 10⁹ UFC (BRASIL, 2008). No entanto, órgãos consultivos e regulamentadores geralmente estipulam que os alimentos que contém organismos probióticos precisam apresentar mais que 10⁶ – 10⁷ UFC/g no momento do consumo (LEE, 2009a). Na Figura 3 podem ser observadas colônias isoladas de BB-12[®] presentes no queijo Minas Frescal após fixação em lâminas e coloração de Gram.

A amostra comercial de queijo Minas Frescal probiótico apresentou valores de acidez, gordura e contagem de bifidobactérias superiores aos obtidos no queijo Minas Frescal probiótico produzido neste estudo. Já o pH resultou em níveis inferiores. A amostra comercial foi analisada com 16 dias de estocagem desde sua produção, e, durante este período, a atividade metabólica das bactérias probióticas que resultam na produção de ácidos orgânicos e as reações de lipólise, podem ter contribuído para o aumento da acidez titulável e a diminuição do pH neste queijo.



Figura 3. Microscopia óptica de colônias de *Bifidobacterium lactis* – BB12[®] isoladas de queijo Minas Frescal. Lente objetiva 100X.

4.2 Viabilidade da bactéria *Bifidobacterium lactis* durante o tempo de estocagem e na simulação ao trato gastrointestinal

Na Tabela 2 são apresentados resultados das contagens da *Bifidobacterium* BB-12[®]. Durante o tempo de 21 dias de estocagem refrigerada, houve um crescimento de aproximadamente um ciclo logarítmico, notado especialmente na primeira semana. Isso se deve ao tempo de acomodação e reativação da bactéria na massa do queijo. Desta forma, após 7 dias, todos os tratamentos apresentaram contagens de 10^7 UFC/g, atendendo a recomendação mínima viável preconizada pela legislação brasileira para alimentos probióticos (BRASIL, 2008) e ao que recomenda a comunidade científica como quantidade terapêutica, ou seja, a concentração de 10^6 e 10^7 UFC/g no produto final, atingindo 10^8 e 10^9 UFC, proveniente de um consumo diário de 100 g ou 100 mL do alimento (TALWALKAR et al., 2004).

Na Figura 4 observa-se que a curva de crescimento da bifidobactéria aumentou em todos os tratamentos ao longo do tempo, especialmente na primeira semana de estocagem. Como mostra a Tabela 2, a contagem total da bifidobactéria

nas amostras não variou estatisticamente ($p > 0,05$) ao longo do 7° ao 21° dia de estocagem. Já em relação ao tipo de embalagem, pode ser observado que os tratamentos com N_2 e CO_2 apresentaram maior viabilidade até o 21° dia de estocagem, diferindo significativamente ($p < 0,05$) da amostra controle (sem AM / vácuo), que por sua vez, apresentou menor contagem dentre todos os tratamentos.

Em um estudo desenvolvido por Kawasaki e colaboradores (2007), determinou-se que a presença de CO_2 é um fator essencial para o crescimento em superfície de cepas de *Bifidobacterium* testadas sob condições anaeróbias. A função do CO_2 não é tanto para melhorar a tolerância ao oxigênio, mas para estimular o crescimento. O mecanismo molecular de demanda de CO_2 das bifidobactérias precisa ser esclarecido mediante pesquisas das enzimas envolvidas na fixação de CO_2 , na hidratação de CO_2 e nas reações de carboxilação. No mecanismo de estimulação do desenvolvimento da colônia de *B. boum* o CO_2 é a forma mais oxidada do carbono e pode atuar como um receptor de elétrons na manutenção do equilíbrio redox celular (KAWASAKI, et al. 2007). Esta hipótese pode explicar o maior desenvolvimento da bifidobactéria nos tratamentos com 100% CO_2 e 100% N_2 , uma vez que no interior da embalagem de N_2 a concentração de CO_2 aumentou ao longo do tempo de estocagem, tendendo à saturação da atmosfera com este gás.

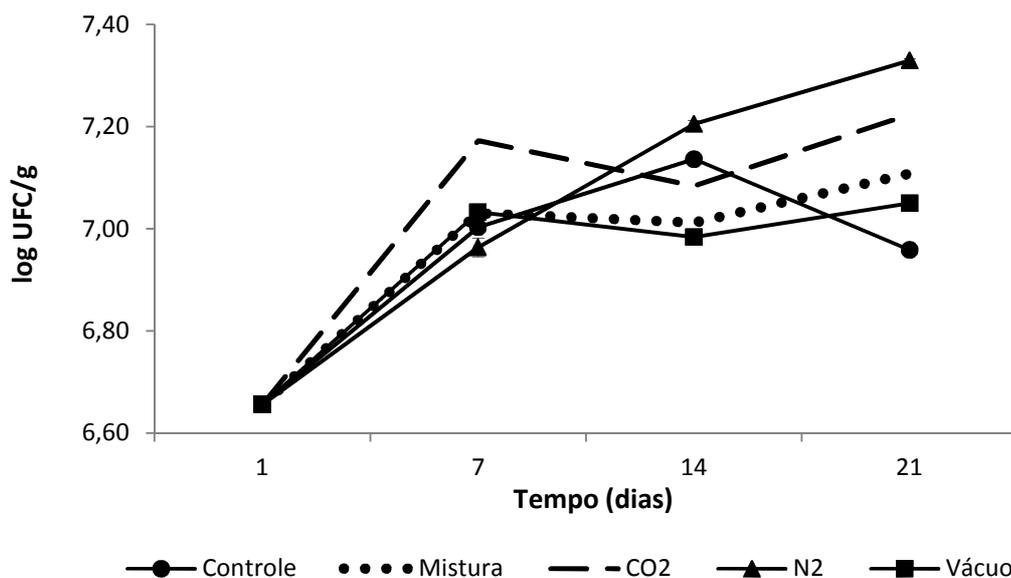


Figura 4. Contagem de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] em queijo Minas Frescal probiótico sob diferentes sistemas de embalagem durante 21 dias de estocagem a 5±1°C. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

A queda na curva de crescimento da *Bifidobacterium* BB-12[®] na amostra controle pode ser explicada pela característica anaeróbia restrita desta bactéria. Como este tipo de embalagem permitia a livre troca gasosa com o ambiente externo, o contato com o oxigênio pode ter influenciado neste comportamento. Como o queijo representa uma matriz compacta, talvez o oxigênio presente na massa não seja o fator determinante, e sim o fato da troca gasosa permitir o crescimento de maior número de micro-organismos aeróbios no queijo durante a estocagem, o que por competição, inibiu o desenvolvimento da bifidobactéria, especialmente após a segunda semana.

Também pode ser observado que, independente da atmosfera presente no interior da embalagem, o queijo Minas frescal permitiu a sobrevivência do probiótico em quantidade recomendada durante toda vida útil do produto. Isso se explica pelo ambiente anaeróbico, ou com baixa taxa de oxigênio, proporcionado ao micro-organismo no interior do queijo. Além disso, o queijo fresco produzido apresentou um pH próximo ao valor neutro, é um produto com alta atividade de água

e foi estocado em ambiente refrigerado, o que também favoreceu o desenvolvimento microbiano.

Com relação à viabilidade ao trato gastrointestinal, as amostras acondicionadas em atmosfera modificada não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), como pode ser visto na Tabela 2. Transcorridos 2 horas de teste entérico, a contagem da bifidobactéria diminuiu um ciclo logaritmo no tratamento controle quando comparado aos demais sistemas de embalagem. Nesta etapa, a amostra foi submetida ao pH ácido, ao suco gástrico artificial e à bile. Diante disso, a redução do número de colônias se justifica pela maior fragilidade dessas bactérias estritamente anaeróbias às substâncias agressivas do trato gastrointestinal, quando as mesmas já foram sensibilizadas pelo contato com oxigênio presente na atmosfera da embalagem durante todo o período de estocagem ou pela competição com os microorganismos aeróbios desenvolvidos. Na Figura 5 pode ser observado o comportamento da curva de crescimento bacteriano ao longo do tempo. Nota-se que os tratamentos com AM e vácuo apresentaram maior viabilidade, sendo que a contagem final não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre eles. No entanto, nota-se uma significativa discrepância ($p < 0,05$) de aproximadamente 2 ciclos logaritmos entre o tratamento com mistura gasosa (1CO₂ : 1N₂) e o tratamento controle.

Tabela 2. Viabilidade da *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] em queijo Minas Frescal probiótico sob diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem refrigerada a 5±1°C.

	Tempo (dias)	Controle	Mistura	CO ₂	N ₂	Vácuo
Contagem total BB-12[®] (log UFC/g)	1	6,66 ± 0,13 ^{aB}	6,66 ± 0,13 ^{aB}	6,66 ± 0,13 ^{aB}	6,66 ± 0,13 ^{aC}	6,66 ± 0,13 ^{aB}
	7	7,00 ± 0,01 ^{abA}	7,03 ± 0,08 ^{abA}	7,17 ± 0,01 ^{aA}	6,96 ± 0,00 ^{bB}	7,03 ± 0,02 ^{abA}
	14	7,14 ± 0,04 ^{abA}	7,01 ± 0,04 ^{abA}	7,08 ± 0,03 ^{abA}	7,21 ± 0,10 ^{aA}	6,98 ± 0,07 ^{bA}
	21	6,96 ± 0,03 ^{cA}	7,11 ± 0,01 ^{bcA}	7,22 ± 0,11 ^{abA}	7,33 ± 0,12 ^{aA}	7,05 ± 0,05 ^{bcA}
	Tempo (minutos)	Controle	Mistura	CO ₂	N ₂	Vácuo
Viabilidade ao Teste Entérico (log UFC/g)	0	5,87 ± 0,04 ^{aA}	6,27 ± 0,05 ^{aA}	5,93 ± 0,01 ^{aA}	6,33 ± 0,05 ^{aA}	6,24 ± 0,14 ^{aA}
	60	6,05 ± 0,05 ^{aA}	6,30 ± 0,16 ^{aA}	5,79 ± 0,98 ^{aA}	6,06 ± 0,03 ^{aA}	6,36 ± 0,06 ^{aA}
	120	6,16 ± 0,05 ^{aA}	6,40 ± 0,88 ^{aA}	5,85 ± 1,46 ^{aA}	6,07 ± 0,12 ^{aA}	6,15 ± 0,08 ^{aA}
	240	5,31 ± 1,03 ^{bA}	6,96 ± 0,00 ^{aA}	6,46 ± 0,21 ^{abA}	6,49 ± 0,73 ^{abA}	6,23 ± 0,22 ^{abA}
	360	5,20 ± 0,07 ^{bA}	6,84 ± 0,07 ^{aA}	6,29 ± 0,51 ^{abA}	6,28 ± 0,90 ^{abA}	6,30 ± 0,02 ^{abA}

Média ± desvio padrão (n = 3). ^{a,b,c} As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tratamento. ^{A,B,C} As médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

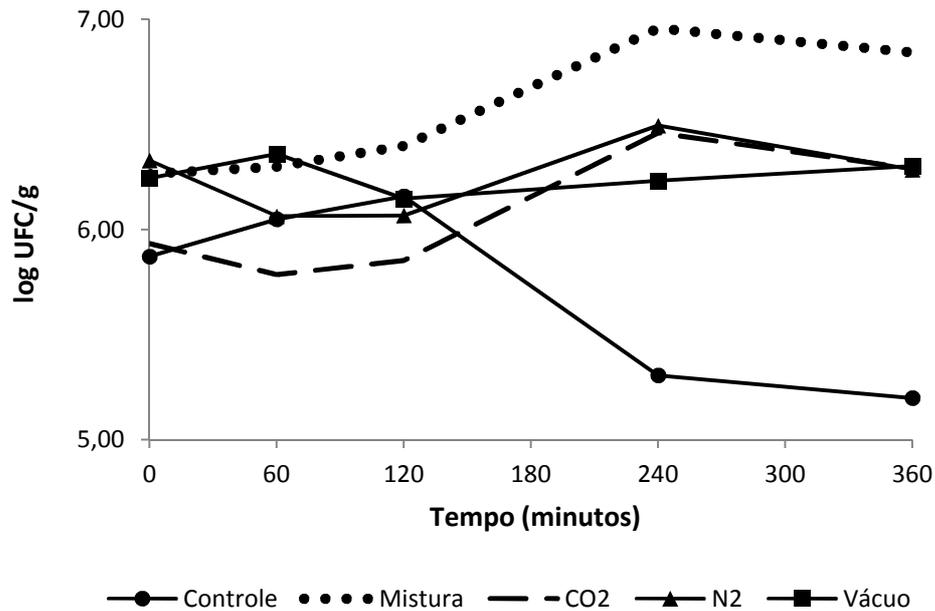


Figura 5. Viabilidade do micro-organismo *Bifidobacterium lactis* BB-12® ao teste entérico realizado após 21 dias de estocagem do queijo Minas Frescal a $5\pm 1^\circ\text{C}$ em diferentes sistemas de embalagem, seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p>0,05$) em relação ao tempo de estocagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

4.3 Quantificação de ácidos orgânicos acético, láctico e cítrico

Os ácidos orgânicos estão presentes em produtos lácteos como resultado da hidrólise de ácidos graxos, da adição de acidulantes (como ácidos cítrico, láctico e propiônico), da bioquímica natural de processos metabólicos do animal (como ácidos cítrico, úrico, ascórbico, entre outros), ou do crescimento microbiano (como ácidos pirúvico, láctico, acético e propiônico) (MARSILI et al., 1981). Desta forma, em produtos lácteos fermentados, o perfil de ácidos orgânicos é um indicador da atividade metabólica de culturas bacterianas adicionadas (ADHIKARI et al., 2002).

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do perfil dos ácidos orgânicos (láctico, acético e cítrico) presentes nas amostras de queijo Minas frescal probiótico ao longo da estocagem. Como pode ser notado, a concentração de ácido acético aumentou de maneira semelhante entre as amostras, tanto ao longo do

tempo, como em relação aos tipos de tratamento ($p > 0,05$). Na Figura 6 pode-se observar que de maneira geral, a concentração de ácido acético aumentou após o sétimo dia de estocagem, para todas as amostras, o que vai de acordo com a curva de crescimento da bifidobactéria apresentada na Figura 4. Este resultado se explica pelo fato das bifidobactérias produzirem ácido acético e ácido lático a partir da lactose pela via frutose-6-fosfato. A rota fermentativa resulta em 3 moles de ácido acético e 2 moles de ácido lático para cada 2 moles de glicose, o que gera uma razão molar de 3 : 2 (acético : lático) (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006). Desta forma, à medida que há um maior desenvolvimento microbiano, o teor desses ácidos, especialmente do acético, por consequência, tende a aumentar.

Diante disso, assim como o ácido acético, a concentração de ácido lático aumentou após uma semana de estocagem, sendo que as maiores concentrações finais ocorreram nas amostras com N_2 e com mistura de gases (CO_2 / N_2). Como apresentado na Figura 6, a menor concentração de ácido lático ocorreu na amostra controle, resultado do crescimento inferior de bifidobactérias em relação aos outros tratamentos (Figura 4). Nota-se também na Tabela 3 que a concentração de ácido lático superou a concentração de ácido acético, apesar da razão em moles entre os ácidos ser 3 acetatos para 2 lactatos. No entanto, deve-se considerar o resultado do metabolismo das bactérias NSLAB (*non starter lactic acid bacteria*). Algumas espécies de bactérias produtoras de ácido lático são termofílicas, como a *Streptococcus thermophilus* (ROBINSON; LTSARANUWAT, 2002) e por isso, podem resistir à pasteurização do leite. Segundo Ong, Henriksson e Shah (2006), acredita-se que as NSLAB ganham acesso ao queijo durante a manufatura ou sobrevivem à pasteurização. Em queijos feitos a partir de leite pasteurizado, as NSLAB apresentam uma baixa contagem ($< 10^3$ UFC/g) no início do período de estocagem e que pode aumentar rapidamente (10^8 UFC/g) entre 2 e 4 meses (FARKYE; VEDAMUTHU, 2002). A contribuição de ácido lático proveniente da formulação do queijo na concentração total foi mínima, já que o teor inicial apresentado foi de apenas 0,24 mg/g.

De acordo com Walstra, Wouters e Geurts (2006), o leite apresenta naturalmente cerca de 0,17 % (m/m) de ácido cítrico, o que está de acordo com o teor inicial nas amostras do queijo probiótico (Tabela 3). No entanto, esta

concentração apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo em todos os tratamentos. A amostra controle apresentou um decréscimo mais atenuado, conforme Figura 6, o que concorda com o menor desenvolvimento da bifidobactéria nesse tratamento. Da mesma maneira, os resultados publicados por Adhikari e colaboradores (2002) sobre o perfil de ácidos orgânicos em iogurtes probióticos, mostraram que na fermentação houve uma grande redução do teor de ácido cítrico indicando que as bifidobactérias poderiam ter utilizado parte deste ácido. De acordo com Jalili, Razavi e Safari (2010), que estudaram o desenvolvimento da BB-12[®] em leite desnatado, existe uma alta correlação entre o consumo de ácido cítrico pela bactéria e o aumento da produção de ácido succínico durante a fase estacionária de crescimento da *B. animalis subsp. lactis* BB-12[®], indicando que estes ácidos sejam metabolizados em rotas semelhantes.

Tabela 3. Composição em ácidos orgânicos do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem refrigerada a 5±1°C.

	Controle	Mistura	CO ₂	N ₂	Vácuo
Tempo (dias)	Ácido Acético (mg/g)				
0	1,35 ± 0,18 ^{aC}	1,35 ± 0,18 ^{aB}			
7	1,00 ± 0,16 ^{aC}	1,42 ± 0,25 ^{aB}	1,28 ± 0,22 ^{aB}	1,44 ± 0,38 ^{aB}	1,18 ± 0,13 ^{aB}
14	1,88 ± 0,13 ^{bB}	2,55 ± 0,23 ^{aA}	2,34 ± 0,39 ^{abA}	2,30 ± 0,81 ^{abA}	2,77 ± 0,18 ^{aA}
21	2,88 ± 0,67 ^{aA}	2,81 ± 0,20 ^{aA}	2,36 ± 0,24 ^{aA}	2,34 ± 0,52 ^{aA}	2,62 ± 0,24 ^{aA}
Tempo (dias)	Ácido Láctico (mg/g)				
0	0,24 ± 0,08 ^{aC}	0,24 ± 0,08 ^{aD}	0,24 ± 0,08 ^{aD}	0,24 ± 0,08 ^{aD}	0,24 ± 0,08 ^{aC}
7	0,19 ± 0,07 ^{cC}	1,27 ± 0,76 ^{aC}	0,69 ± 0,01 ^{bC}	1,31 ± 0,22 ^{aC}	0,46 ± 0,38 ^{bcC}
14	1,75 ± 0,11 ^{dB}	5,37 ± 0,51 ^{aB}	3,07 ± 0,13 ^{cB}	3,82 ± 0,72 ^{bB}	2,86 ± 0,08 ^{cB}
21	2,32 ± 0,25 ^{cA}	6,21 ± 0,03 ^{aA}	4,27 ± 0,08 ^{bA}	5,96 ± 0,44 ^{aA}	4,03 ± 0,18 ^{bA}
Tempo (dias)	Ácido Cítrico (mg/g)				
0	2,16 ± 0,18 ^{aA}	2,16 ± 0,18 ^{aA}	2,16 ± 0,18 ^{aA}	2,16 ± 0,18 ^{aA}	2,16 ± 0,18 ^{aA}
7	2,20 ± 0,15 ^{aA}	1,67 ± 0,49 ^{abA}	1,75 ± 0,22 ^{abA}	1,67 ± 0,33 ^{abA}	1,51 ± 0,62 ^{bB}
14	1,65 ± 0,74 ^{aAB}	0,66 ± 0,11 ^{bB}	0,91 ± 0,41 ^{bB}	0,94 ± 0,74 ^{bB}	0,78 ± 0,33 ^{bC}
21	1,36 ± 0,58 ^{aB}	0,68 ± 0,22 ^{bB}	0,80 ± 0,28 ^{abB}	0,70 ± 0,31 ^{abB}	0,46 ± 0,20 ^{bC}

Média ± desvio padrão (n = 3). ^{a, b, c, d} As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tratamento. ^{A, B, C, D} As médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

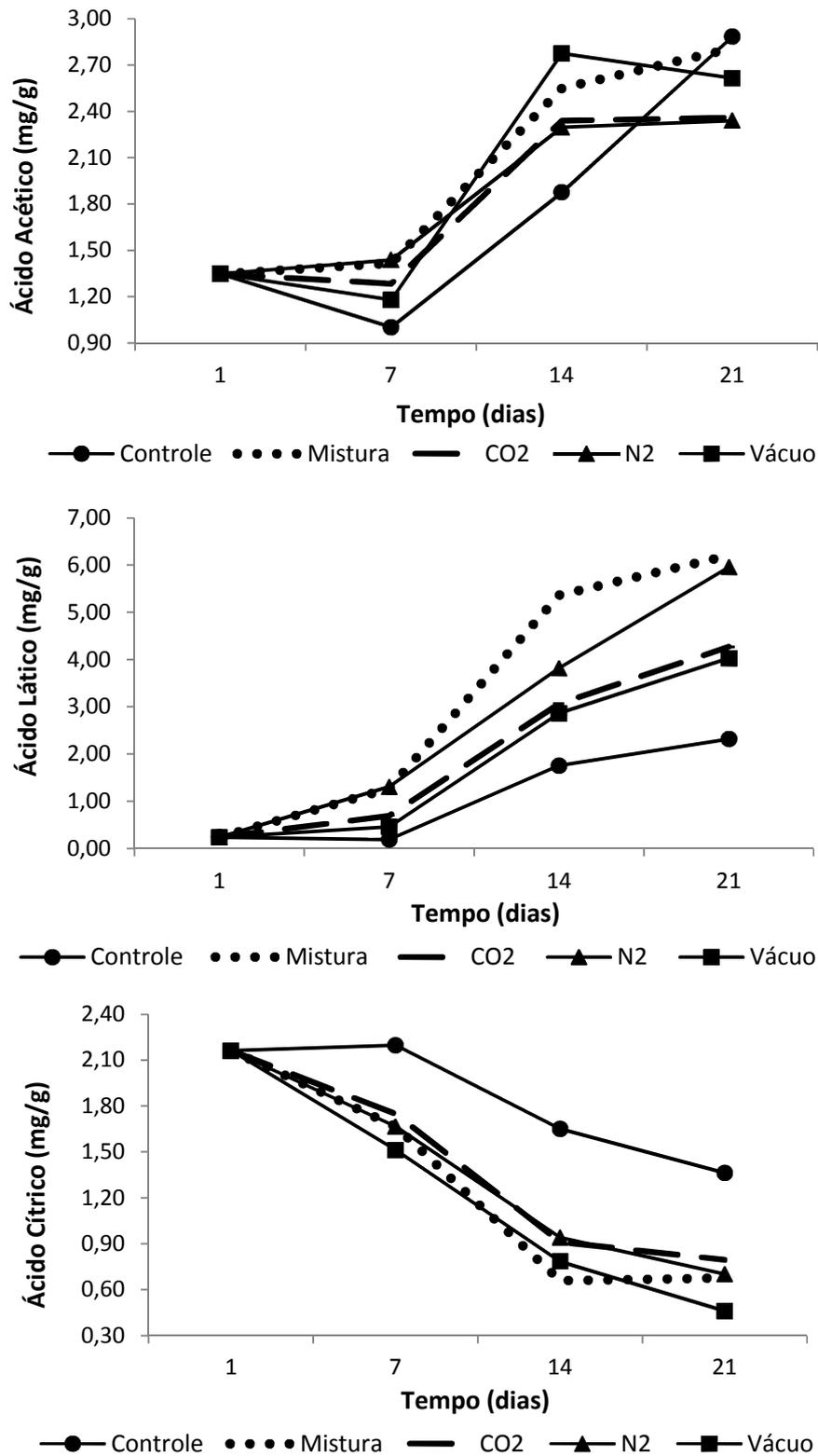


Figura 6. Concentração dos ácidos orgânicos (acético, láctico e cítrico) no decorrer de 21 dias de estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ do queijo Minas Frescal probiótico acondicionados sob diferentes sistemas de embalagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

4.4 Avaliação da acidez titulável, pH, umidade e atividade proteolítica

A Tabela 4 apresenta as características físico-químicas do queijo Minas Frescal probiótico. Ao longo do tempo, o teor de acidez aumentou e, conseqüentemente, o pH apresentou decréscimo. Este resultado aparece em maior significância ($p < 0,05$) na amostra controle. Isso indica que houve pós-acidificação do queijo durante o período de estocagem refrigerada em decorrência do metabolismo fermentativo das bifidobactérias e das NSLAB, conforme já discutido no item 4.3.

De maneira geral, o teor de umidade das amostras apresentou baixa redução no decorrer do tempo, o que pode ser visto mais significativamente nos primeiros sete dias de estocagem refrigerada. Como pode ser observado na Tabela 4, em comparação aos tipos de tratamento, o teor de umidade não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Conforme mencionado, a Instrução Normativa nº 4 (BRASIL, 2004) caracteriza o queijo Minas Frescal como de muito alta umidade (maior que 55%). A baixa perda de umidade ocorreu devido à sinérese durante a estocagem refrigerada, que expulsa parte do soro retido na massa do queijo. Conforme pode ser notado na Figura 7, o soro permaneceu retido na embalagem, influenciando na perda de umidade das amostras. Fox et al. (2000) observaram que o aumento da concentração de íons H^+ na pós acidificação do produto, aliado ao baixo teor de sal neste tipo de queijo, faz com que a força de repulsão entre as micelas de caseína diminua, promovendo sua agregação e, conseqüentemente, a expulsão do soro e o aparecimento da sinérese.

Também pode ser notado na Tabela 4, que a atividade proteolítica aumentou no decorrer do tempo em todos os tratamentos, sendo que o resultado de maior expressão ocorreu na amostra controle ($p < 0,05$). De maneira geral, como este é um queijo fresco e por isso, tem um curto período de vida útil, uma baixa atividade proteolítica foi observada em 21 dias. Masuda et al. (2005) também obtiveram valores baixos de atividade proteolítica em queijo fresco não adicionado de bactéria probiótica. Em relação à influência da bifidobactéria, conforme apresentado por Bergamini e colaboradores (2009), este gênero apresenta uma fraca atividade proteolítica. Portanto, a proteólise observada durante o período de estocagem pode ter ocorrido sob influência da quimosina remanescente do coalho e enzimas originadas da atividade bacteriana.

No entanto, a ocorrência da maior taxa de proteólise na amostra controle pode ser explicada pela presença de oxigênio no interior da embalagem. Na realidade, o oxigênio influenciaria indiretamente, já que o ambiente aeróbio formado possibilita o desenvolvimento de um maior número de micro-organismos com propriedades proteolíticas. Desta forma, segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), as enzimas proteolíticas podem ser provenientes de diversas fontes, como das bactérias ácidos lácticas, da flora desenvolvida na superfície do queijo durante a estocagem ou no seu interior e das bactérias resistentes à pasteurização do leite.

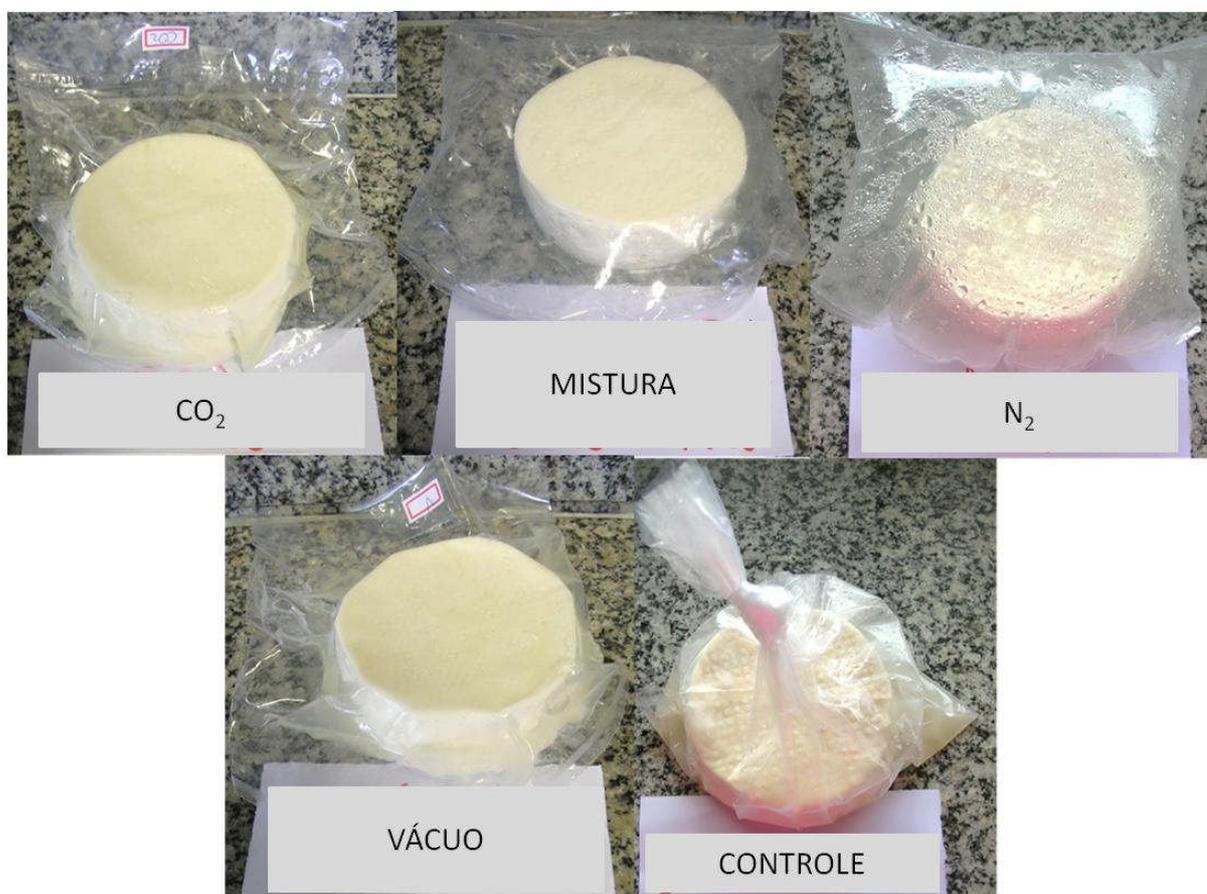


Figura 7. Queijo Minas Frescal probiótico com 21 dias de estocagem refrigerada a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

Tabela 4. Composição físico-química do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem após 21 dias de estocagem a $5\pm 1^\circ\text{C}$.

	Tempo (dias)	Controle	Mistura	CO ₂	N ₂	Vácuo
Acidez (%)	1	0,11 ± 0,01 ^{aB}	0,11 ± 0,01 ^{aB}	0,11 ± 0,01 ^{aA}	0,11 ± 0,01 ^{aB}	0,11 ± 0,01 ^{aC}
	7	0,13 ± 0,02 ^{aB}	0,13 ± 0,02 ^{aB}	0,12 ± 0,01 ^{aA}	0,12 ± 0,02 ^{aB}	0,13 ± 0,04 ^{aBC}
	14	0,16 ± 0,04 ^{aAB}	0,16 ± 0,05 ^{aAB}	0,13 ± 0,03 ^{aA}	0,13 ± 0,04 ^{aAB}	0,18 ± 0,05 ^{aAB}
	21	0,21 ± 0,05 ^{aA}	0,18 ± 0,08 ^{abA}	0,15 ± 0,04 ^{ba}	0,19 ± 0,08 ^{abA}	0,19 ± 0,07 ^{abA}
pH	1	6,28 ± 0,11 ^{aA}	6,28 ± 0,11 ^{aA}	6,28 ± 0,11 ^{aA}	6,28 ± 0,11 ^{aA}	6,28 ± 0,11 ^{aA}
	7	6,21 ± 0,08 ^{aAB}	6,16 ± 0,10 ^{aAB}	6,19 ± 0,05 ^{aAB}	6,13 ± 0,06 ^{aAB}	6,12 ± 0,16 ^{aAB}
	14	6,03 ± 0,11 ^{aBC}	6,01 ± 0,18 ^{aBC}	6,11 ± 0,17 ^{aAB}	6,08 ± 0,14 ^{aB}	5,96 ± 0,23 ^{aBC}
	21	5,84 ± 0,13 ^{aC}	5,87 ± 0,22 ^{aC}	6,03 ± 0,27 ^{aB}	5,87 ± 0,23 ^{aC}	5,88 ± 0,17 ^{aC}
Umidade (%)	1	60,87 ± 2,88 ^{aA}	60,87 ± 2,88 ^{aA}	60,87 ± 2,88 ^{aA}	60,87 ± 2,88 ^{aA}	60,87 ± 2,88 ^{aA}
	7	59,13 ± 1,97 ^{aA}	56,74 ± 2,54 ^{abB}	55,27 ± 2,81 ^{bB}	55,66 ± 1,86 ^{abB}	58,28 ± 1,94 ^{abA}
	14	57,60 ± 2,80 ^{aA}	57,31 ± 2,10 ^{aB}	56,64 ± 2,48 ^{aB}	56,86 ± 3,47 ^{aB}	57,87 ± 2,49 ^{aA}
	21	58,52 ± 3,50 ^{aA}	55,83 ± 2,86 ^{aB}	56,71 ± 1,69 ^{aB}	56,62 ± 2,40 ^{aB}	58,95 ± 2,36 ^{aA}
Atividade Proteolítica (Abs. n=340nm)	1	0,03 ± 0,01 ^{aC}	0,03 ± 0,01 ^{aB}	0,03 ± 0,01 ^{aB}	0,03 ± 0,01 ^{aC}	0,03 ± 0,01 ^{aB}
	7	0,03 ± 0,00 ^{aC}	0,04 ± 0,00 ^{aB}	0,05 ± 0,00 ^{aAB}	0,04 ± 0,02 ^{aC}	0,04 ± 0,00 ^{aB}
	14	0,14 ± 0,03 ^{aA}	0,10 ± 0,01 ^{ba}	0,07 ± 0,02 ^{ca}	0,07 ± 0,01 ^{cb}	0,06 ± 0,01 ^{ca}
	21	0,11 ± 0,01 ^{aB}	0,10 ± 0,01 ^{aA}	0,07 ± 0,00 ^{ba}	0,09 ± 0,00 ^{abA}	0,07 ± 0,01 ^{ba}

Média ± desvio padrão (n = 3). ^{a,b,c} As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$) em relação ao tratamento. ^{A,B,C} As médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$) em relação ao tempo de estocagem. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

4.5 Taxa de permeabilidade ao oxigênio do laminado e composição gasosa do interior da embalagem

A embalagem flexível de Nylon/PEBD apresentou espessura de $48,50 \pm 1,66 \mu\text{m}$ e taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) de $45,38 \pm 1,05 \text{ cm}^3$ (CNTP)/(m².dia) a 23°C e 50% de umidade. Estes valores estão próximos aos encontrados por Oliveira et al. (2006) quando analisaram filmes com poliamida (PA) que apresentaram TPO₂ entre 32 e 72 cm³(CNTP)/m²/dia a 23°C e 50% de umidade.

O controle do volume de oxigênio presente em uma embalagem é de fundamental importância para a durabilidade de muitos produtos alimentícios. Embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada são normalmente utilizadas para proteger os produtos do oxigênio. A taxa de permeabilidade ao oxigênio é uma característica importante dos materiais flexíveis com propriedade de barreira. Entretanto, não é apenas esta característica que define a estabilidade de um produto sensível ao oxigênio, mas também o oxigênio incorporado no produto, aquele presente no espaço livre da embalagem, e a integridade do fechamento da embalagem, são parâmetros que afetam a sua estabilidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Na Figura 8 pode ser observado o comportamento das concentrações de oxigênio e gás carbônico no espaço livre das embalagens dos 5 tratamentos ao longo do tempo de estocagem refrigerada. No tratamento com embalagem a vácuo, as concentrações de O_2 e CO_2 permaneceram nulas ao longo de todo o período de estocagem, o que demonstra a capacidade de barreira aos gases do filme utilizado e a eficiência da termoselagem nestas embalagens. Além disso, baixas temperaturas reduzem significativamente a taxa de permeabilidade aos gases dos materiais de embalagem.

Sabe-se que as concentrações de O_2 e CO_2 do ar atmosférico são de aproximadamente 20% e 0,03%, respectivamente. A concentração de O_2 presente na amostra controle decresceu drasticamente ao longo do tempo. Este comportamento sugere que, a medida em que as culturas de micro-organismos aeróbios presentes no queijo e no interior da embalagem se desenvolviam, um maior consumo de oxigênio foi verificado. Desta forma, pode-se sugerir que a taxa de O_2 permeado na embalagem de PEBD foi menor que a taxa de oxigênio consumida pelos micro-organismos presentes na amostra.

Em relação ao CO_2 , pode-se perceber que a embalagem com 100% de CO_2 apresentou vácuo em sete dias de estocagem, ou seja, este gás foi totalmente solubilizado ou possivelmente consumido. Já nas embalagens envasadas com 100% de N_2 e na amostra controle, em menor proporção, houve aumento da concentração de CO_2 , o que pode ser explicado pela produção deste gás pelos micro-organismos presentes no interior da embalagem. A amostra envasada com mistura 1:1 de

CO₂/N₂ apresentou queda na concentração de CO₂ na primeira semana, porém após este período, nota-se um aumento do teor deste gás. De acordo com Ray (2005), algumas espécies de bactérias lácticas fermentam a glicose produzindo uma mistura de ácido láctico, etanol, ácido acético e CO₂. Diante disso, pode-se considerar a hipótese de que a atividade metabólica dessas bactérias contribuiu para o aumento da concentração de CO₂, em especial nos tratamentos com N₂ e mistura de CO₂/N₂. Ademais, as bifidobactérias são heterofermentativa e são, portanto, capazes de produzir alguns tipos de ácidos e pequenas quantidades de CO₂ (JALILI; RAZAVI; SAFARI, 2010).

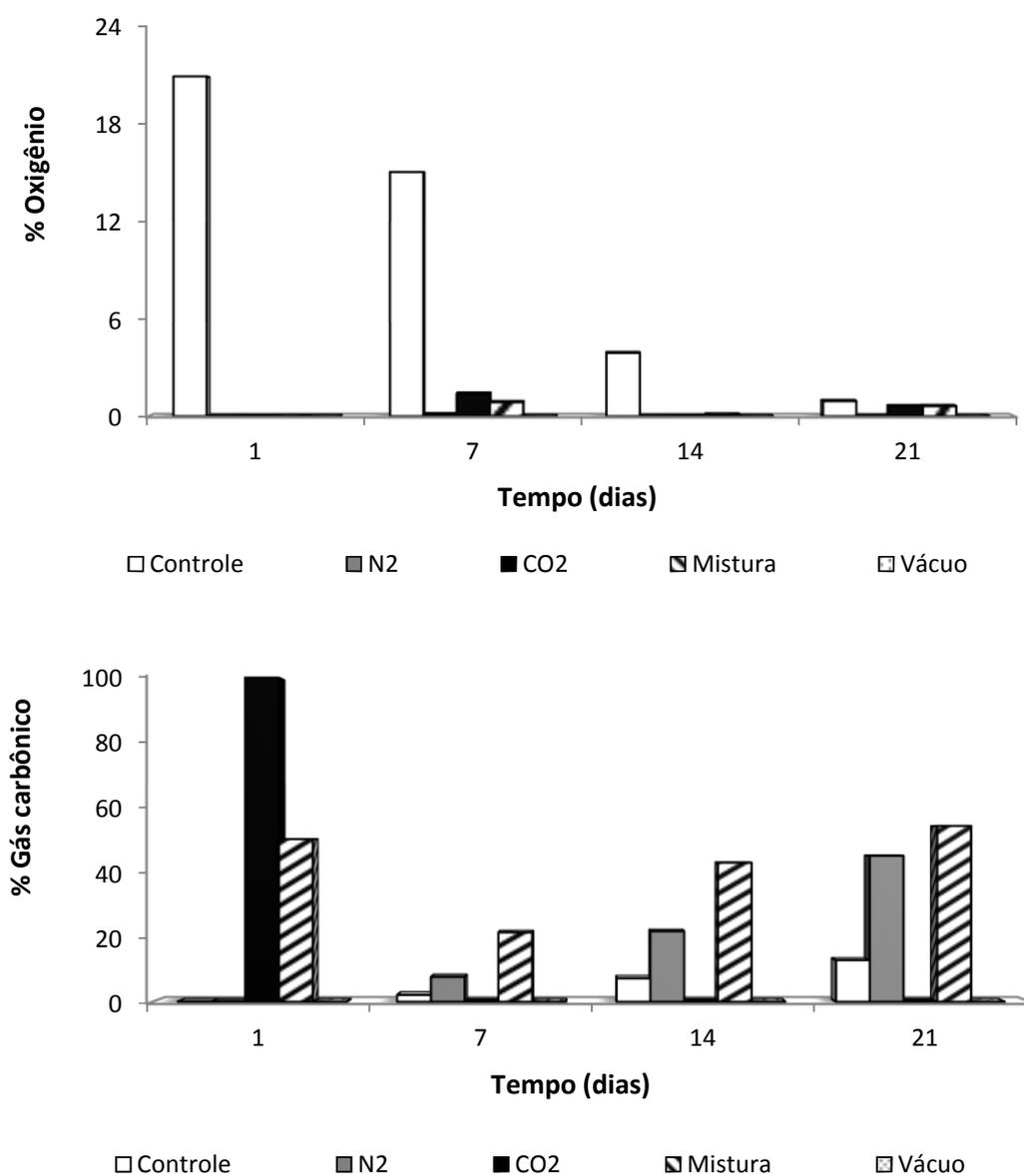


Figura 8. Comportamento dos gases O_2 e CO_2 no espaço livre dos sistemas de embalagem durante a estocagem do queijo Minas Frescal probiótico a $5 \pm 1^\circ C$. Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

As composições de gases aplicadas na embalagem de queijos podem variar de 10% a 100% de CO₂, tipicamente equilibrada com N₂ como um gás inerte de enchimento, prevenindo o colapso da embalagem resultante da solubilização do CO₂. Como consequência, o CO₂ é capaz de provocar uma troca dinâmica entre o alimento e a atmosfera do espaço livre. O grau desta troca depende das propriedades do alimento, tais como a solubilidade específica do CO₂ no queijo, bem como da relação entre o volume do alimento e do gás no espaço livre da embalagem, e da concentração inicial de CO₂, tanto na embalagem quanto no alimento. Este processo de equilíbrio dinâmico é relativamente rápido e é esperado que ocorra dentro do primeiro dia após a embalagem (JAKOBSEN, BERTELSEN; 2002). Durante o transporte e o período de estocagem, este intercâmbio do CO₂ continuará como resposta às mudanças nas condições de temperatura. No caso do queijo acondicionado em atmosfera modificada, o volume do gás aplicado (isto é, do espaço livre) é geralmente pequeno em comparação com o volume do queijo, para agir como um tampão adequado para o equilíbrio de CO₂, e, com isso, grandes alterações no volume do espaço livre e na composição da atmosfera gasosa podem ocorrer. O fato de que as embalagens são frequentemente flexíveis ou semiflexíveis resulta tanto na contração (colapso) ou expansão da embalagem. Em alguns casos, esta contração é totalmente intencional para criar uma embalagem a vácuo, e, em outros casos, estas variações de volume são indesejadas e podem causar a rejeição pelo consumidor no momento da compra (FAVA; PIERGIOVANNI, 1992).

4.6 Análises reológicas

4.6.1 TPA

O efeito da atmosfera modificada nas propriedades de textura de queijos do tipo Minas Frescal acondicionados a 5±1°C durante 21 dias está apresentado na Tabela 5. De forma geral as propriedades de dureza, gomosidade e mastigabilidade sofreram um incremento ao longo dos 14 primeiros dias de estocagem seguida de decréscimo após esse período. Os tratamentos CO₂ e N₂ proporcionaram um aumento na dureza e gomosidade quando comparadas ao controle. A

mastigabilidade apresentou decréscimo para todos os tratamentos. A amostra comercial apresentou valores significativamente ($p>0,05$) menores de dureza, gomosidade e mastigabilidade quando comparados aos demais tratamentos. Essas diferenças puderam ser percebidas também no teste sensorial de ideal de textura, na qual a amostra comercial foi avaliada como menos consistente que o ideal (Figura 12). Contudo, a amostra comercial apresentou valor significativamente maior de adesividade. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa. A adesividade sofreu decréscimo significativo ao longo dos 14 dias de estocagem para todos os tratamentos. A elasticidade indica a capacidade que um material tem de recuperar a sua forma original após ter sido deformado durante o primeiro ciclo de compressão da análise de perfil de textura (BOURNE, 1978). Os tratamentos não apresentaram diferença significativa com relação à elasticidade, mas observou-se um aumento dessa propriedade ao longo de 14 dias de estocagem. Neste estudo, as amostras de queijo tenderam a ter sua resiliência significativamente ($p>0,05$) aumentada para todas as formulações ao longo dos 21 dias de estocagem. Esse comportamento indica um aumento na resistência das amostras à deformação ao longo do tempo. A coesividade representa a capacidade da amostra de manter a sua estrutura após a compressão (BOURNE, 1978). Essa propriedade tendeu a aumentar após 1 dia de estocagem permanecendo estável após esse período, o que, provavelmente, deve-se ao efeito do teor de gordura sobre a coesão.

Tabela 5. Análise de perfil de textura das amostras de queijo Minas Frescal probiótico.

Amostra	Tempo (dias)	Dureza (N)	Adesividade (N.s)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade	Mastigabilidade (N)	Resiliência
Comercial	-	526,99 ± 114,74 ^b	-31,75 ± 25,12 ^b	0,83 ± 0,03 ^b	0,74 ± 0,03 ^b	392,44 ± 97,94 ^b	325,67 ± 84,54 ^b	0,39 ± 0,02 ^b
Controle	1	1076,96 ± 46,36 ^{aB}	-20,78 ± 24,38 ^{aA}	0,82 ± 0,03 ^{aB}	0,71 ± 0,03 ^{aB}	766,90 ± 52,64 ^{aB}	631,00 ± 36,23 ^{aB}	0,40 ± 0,01 ^{aB}
	7	719,58 ± 34,26 ^{bcC}	-13,12 ± 19,56 ^{aA}	0,81 ± 0,02 ^{aB}	0,76 ± 0,01 ^{abA}	543,63 ± 26,75 ^{cC}	440,81 ± 17,68 ^{aC}	0,44 ± 0,01 ^{abA}
	14	1520,60 ± 154,64 ^{abA}	-7,99 ± 3,10 ^{abA}	0,88 ± 0,00 ^{aA}	0,76 ± 0,02 ^{abA}	1156,30 ± 133,39 ^{bA}	1014,72 ± 118,52 ^{aA}	0,46 ± 0,02 ^{abA}
	21	1009,28 ± 117,65 ^{aB}	-6,53 ± 2,55 ^{abA}	0,84 ± 0,01 ^{aB}	0,76 ± 0,01 ^{aB}	770,82 ± 90,52 ^{aB}	644,99 ± 79,05 ^{aB}	0,45 ± 0,01 ^{abA}
CO₂	1	1076,96 ± 46,36 ^{aA}	-20,78 ± 24,38 ^{aA}	0,82 ± 0,03 ^{aA}	0,71 ± 0,03 ^{aA}	766,90 ± 52,64 ^{aB}	631,00 ± 36,23 ^{aAB}	0,40 ± 0,01 ^{aB}
	7	1128,55 ± 283,89 ^{aA}	-19,39 ± 27,65 ^{aA}	0,77 ± 0,14 ^{bB}	0,78 ± 0,04 ^{aA}	879,93 ± 215,67 ^{aB}	696,03 ± 259,97 ^{aA}	0,47 ± 0,03 ^{aA}
	14	1386,01 ± 155,18 ^{abA}	-17,41 ± 26,69 ^{aA}	0,87 ± 0,01 ^{abA}	0,75 ± 0,01 ^{aB}	1037,89 ± 120,76 ^{bA}	906,39 ± 109,78 ^{aA}	0,45 ± 0,01 ^{bA}
	21	989,99 ± 138,19 ^{aB}	-16,45 ± 24,18 ^{aA}	0,85 ± 0,01 ^{aA}	0,76 ± 0,01 ^{aB}	749,21 ± 109,97 ^{aB}	638,75 ± 96,75 ^{aAB}	0,46 ± 0,01 ^{aA}
Vácuo	1	1076,96 ± 46,36 ^{aA}	-20,78 ± 24,38 ^{aA}	0,82 ± 0,03 ^{aAB}	0,71 ± 0,03 ^{aB}	766,90 ± 52,64 ^{aA}	631,00 ± 36,23 ^{aA}	0,40 ± 0,01 ^{aC}
	7	783,26 ± 97,32 ^{bcB}	-14,78 ± 21,63 ^{aA}	0,81 ± 0,02 ^{aB}	0,75 ± 0,01 ^{abA}	586,78 ± 79,77 ^{cC}	477,49 ± 75,19 ^{aC}	0,43 ± 0,01 ^{abB}
	14	1092,24 ± 173,36 ^{cA}	-6,49 ± 4,33 ^{abA}	0,86 ± 0,01 ^{bA}	0,75 ± 0,01 ^{bA}	824,73 ± 136,72 ^{cA}	705,61 ± 120,59 ^{bA}	0,44 ± 0,01 ^{cAB}
	21	878,24 ± 75,38 ^{bb}	-6,68 ± 4,12 ^{abA}	0,84 ± 0,00 ^{aB}	0,76 ± 0,01 ^{aB}	665,14 ± 58,50 ^{aAB}	558,27 ± 51,15 ^{bb}	0,46 ± 0,01 ^{aA}
N₂	1	1076,96 ± 46,36 ^{aB}	-20,78 ± 24,38 ^{aA}	0,82 ± 0,03 ^{aC}	0,71 ± 0,03 ^{aC}	766,90 ± 52,64 ^{aB}	631,00 ± 36,23 ^{aB}	0,40 ± 0,01 ^{aB}
	7	882,56 ± 77,59 ^{abB}	-6,07 ± 1,80 ^{abA}	0,81 ± 0,01 ^{aC}	0,75 ± 0,01 ^{abB}	663,65 ± 54,58 ^{bB}	540,11 ± 46,29 ^{aC}	0,44 ± 0,01 ^{abA}
	14	1787,06 ± 62,36 ^{aA}	-6,31 ± 2,49 ^{abA}	0,88 ± 0,01 ^{aA}	0,75 ± 0,01 ^{bB}	1348,24 ± 57,40 ^{aA}	1182,09 ± 46,53 ^{aA}	0,45 ± 0,01 ^{bA}
	21	939,25 ± 150,30 ^{aB}	-17,56 ± 24,39 ^{aA}	0,84 ± 0,01 ^{aB}	0,78 ± 0,01 ^{aA}	729,09 ± 124,28 ^{aB}	615,68 ± 114,94 ^{aB}	0,46 ± 0,02 ^{aA}
Mistura	1	1076,96 ± 46,36 ^{aA}	-20,78 ± 24,38 ^{aA}	0,82 ± 0,03 ^{aBC}	0,71 ± 0,03 ^{aB}	766,90 ± 52,64 ^{aA}	631,00 ± 36,23 ^{aAB}	0,40 ± 0,01 ^{aC}
	7	888,52 ± 129,28 ^{abA}	-14,11 ± 20,96 ^{aA}	0,81 ± 0,02 ^{aC}	0,77 ± 0,01 ^{aA}	683,23 ± 102,27 ^{bA}	556,29 ± 93,28 ^{aAB}	0,45 ± 0,01 ^{abAB}
	14	1080,30 ± 112,31 ^{cA}	-5,67 ± 0,69 ^{abA}	0,86 ± 0,01 ^{bA}	0,78 ± 0,00 ^{aA}	841,83 ± 87,80 ^{cA}	719,74 ± 75,33 ^{bA}	0,47 ± 0,00 ^{aA}
	21	942,11 ± 234,88 ^{aA}	-18,59 ± 23,18 ^{aA}	0,84 ± 0,01 ^{aB}	0,77 ± 0,01 ^{abA}	724,61 ± 186,97 ^{aA}	610,02 ± 157,49 ^{aA}	0,46 ± 0,01 ^{aA}

Média ± desvio padrão (n = 6). ^{a,b,c} As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tratamento. ^{A,B,C} As médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

4.6.2 Compressão Uniaxial

Os valores para o módulo de elasticidade (E), deformação de ruptura (ϵ_{rup}), tensão de ruptura (σ_{rup}), e trabalho de ruptura (W_{rup}) calculados para as amostras de queijo Minas Frescal submetidos a diferentes condições atmosféricas durante estocagem refrigerada a $5\pm 1^\circ\text{C}$ por 21 dias são apresentados na Tabela 6. O módulo de elasticidade (ou módulo de Young) proporciona uma útil indicação do quão facilmente uma amostra pode ser comprimida e/ou esticada, por vezes referido como a rigidez do material e corresponde à inclinação da porção linear da curva σ_t - ϵ_t , onde a lei única de Hooke é válida (GUNASEKARAN e AK, 2002; FOX et al., 2000). A tensão de ruptura está relacionada com a tenacidade da amostra, isto é, sua resistência à compressão, enquanto que o trabalho de ruptura está diretamente relacionado com a dureza da amostra (FOX et al., 2000). A deformação na ruptura denota a tensão necessária para causar um ponto de ruptura na amostra e pode ser associado com a friabilidade das amostras (CUNHA et al., 2006).

De forma geral todos os parâmetros reportados neste trabalho foram maiores que os reportados na literatura (DANTAS et al., 2015; FELICIO et al., 2016), indicando uma maior rigidez das amostras. Contudo, os valores de tensão de ruptura foram inferiores as amostras comerciais apresentadas por Magenis et al. (2014). A amostra CO_2 apresentou maiores valores de módulo de elasticidade, tensão de ruptura e trabalho de ruptura, indicando maiores níveis de elasticidade, tenacidade e dureza quando comparada ao controle. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa em comparação ao controle. De forma geral, o módulo de elasticidade e tensão de ruptura apresentaram decréscimo após 1 dia de estocagem seguido de incremento no valor dessas propriedades o que indica um possível aumento na rigidez e dureza das amostras ao longo de 21 dias de estocagem. Isso pode estar associado a um rearranjo da estrutura protéica dos queijos ao longo da estocagem ou a perda de água por exsudação e consequente diminuição da umidade do queijo. Resultados semelhantes obtiveram Fritzen-Freire e colaboradores (2010b) com o aumento da tensão de ruptura de queijo Minas Frescal probiótico provocado pela perda de umidade durante a estocagem. As amostras não apresentaram diferenças significativas de deformação de ruptura indicando uma

estabilidade similar ao controle das amostras tratadas no que diz respeito à friabilidade (*crumbliness*). Segundo Ahmed e colaboradores (2005) queijos com alto teor de umidade apresentam maior deformação de ruptura, pois apresentam uma rede protéica mais frágil.

Tabela 6. Parâmetros de compressão uniaxial estimados E (módulo de elasticidade), ϵ_{rup} (deformação de ruptura), σ_{rup} (tensão de ruptura) e W_{rup} (trabalho de ruptura) para as amostras de queijo Minas Frescal probiótico.

Amostra	Tempo (dias)	E (kPa)	ϵ_{rup} (-)	σ_{rup} (kPa)	W_{rup} (kJ m ⁻³)
Comercial	-	25,27 ± 0,61 ^c	0,77 ± 0,06 ^a	17,49 ± 1,21 ^c	13,43 ± 1,92 ^b
Controle	1	58,44 ± 3,37 ^{aA}	0,58 ± 0,03 ^{bC}	31,16 ± 0,17 ^{aAB}	18,04 ± 0,71 ^{aAB}
	7	44,95 ± 7,14 ^{abB}	0,64 ± 0,02 ^{bBC}	24,98 ± 3,37 ^{abB}	15,97 ± 1,57 ^{abB}
	14	41,35 ± 0,08 ^{bB}	0,75 ± 0,06 ^{aA}	27,72 ± 1,52 ^{bAB}	20,88 ± 2,65 ^{abcAB}
	21	54,75 ± 0,11 ^{abA}	0,68 ± 0,04 ^{abAB}	35,88 ± 3,52 ^{aA}	24,44 ± 3,99 ^{bA}
CO ₂	1	58,44 ± 3,37 ^{aAB}	0,58 ± 0,03 ^{bB}	31,16 ± 0,17 ^{ab}	18,04 ± 0,71 ^{ab}
	7	52,39 ± 5,50 ^{aB}	0,74 ± 0,02 ^{abA}	34,15 ± 5,01 ^{aAB}	25,21 ± 4,32 ^{aAB}
	14	54,20 ± 0,89 ^{aB}	0,69 ± 0,06 ^{abA}	33,86 ± 1,76 ^{abAB}	23,35 ± 3,25 ^{abAB}
	21	64,74 ± 6,02 ^{aA}	0,66 ± 0,10 ^{bAB}	40,90 ± 10,55 ^{aA}	27,56 ± 11,58 ^{abA}
Vácuo	1	58,44 ± 3,37 ^{aA}	0,58 ± 0,03 ^{bB}	31,16 ± 0,17 ^{aAB}	18,04 ± 0,71 ^{ab}
	7	41,03 ± 2,05 ^{bB}	0,63 ± 0,05 ^{bB}	23,32 ± 0,75 ^{bB}	14,71 ± 1,78 ^{bB}
	14	53,94 ± 8,44 ^{aA}	0,63 ± 0,04 ^{bB}	30,28 ± 3,98 ^{abAB}	18,94 ± 2,90 ^{bcAB}
	21	52,24 ± 5,40 ^{bA}	0,74 ± 0,02 ^{abA}	36,57 ± 4,31 ^{aA}	27,11 ± 3,42 ^{abA}
N ₂	1	58,44 ± 3,37 ^{aA}	0,58 ± 0,03 ^{bB}	31,16 ± 0,17 ^{aAB}	18,04 ± 0,71 ^{ab}
	7	41,99 ± 1,44 ^{abB}	0,64 ± 0,08 ^{bB}	23,88 ± 3,51 ^{bB}	15,48 ± 4,02 ^{bB}
	14	55,75 ± 8,73 ^{aA}	0,75 ± 0,01 ^{aA}	38,68 ± 7,80 ^{aA}	29,16 ± 6,22 ^{aA}
	21	52,65 ± 10,21 ^{bA}	0,78 ± 0,01 ^{aA}	38,74 ± 8,85 ^{aA}	30,22 ± 7,18 ^{abA}
Mistura	1	58,44 ± 3,37 ^{aA}	0,58 ± 0,03 ^{bB}	31,16 ± 0,17 ^{aBC}	18,04 ± 0,71 ^{ab}
	7	38,56 ± 2,25 ^{bB}	0,69 ± 0,05 ^{abA}	23,70 ± 3,58 ^{bC}	16,37 ± 3,85 ^{abB}
	14	53,78 ± 1,31 ^{aA}	0,70 ± 0,01 ^{abA}	33,87 ± 2,04 ^{abB}	23,57 ± 1,67 ^{abB}
	21	59,77 ± 0,50 ^{abA}	0,76 ± 0,01 ^{abA}	45,12 ± 0,90 ^{aA}	34,07 ± 0,70 ^{aA}

Média ± desvio padrão (n = 6). ^{a,b,c,d} As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tratamento. ^{A,B,C,D} As médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

4.6.3 Creep

A principal característica de materiais viscoelásticos é a sua capacidade de se deformarem continuamente quando expostos a uma tensão constante. Os dados de compliância das amostras de queijo Minas Frescal foram ajustadas a um modelo de quatro componentes de Burgers obtendo coeficientes de correlação variando de 0,971 a 0,985. O ajuste foi feito por meio de regressão não-linear utilizando o software STATISTICA. Os parâmetros ajustados são compostos pela compliância instantânea (J_0), a compliância viscoelástica (J_1), o tempo de retardo (τ) e a viscosidade Newtoniana (η_N). A estimativa foi realizada através do método de Levenberg-Marquardt com 500 iterações utilizando como critério de convergência o valor de 10^{-6} para a soma dos mínimos quadrados. Os parâmetros do modelo ajustado são mostrados na Tabela 7. De acordo com Olivares et al. (2009), a compliância instantânea (J_0) representa a resposta elástica no momento inicial da deformação, e pode ser relacionada com a estrutura da rede proteica no início da compressão (MA et al., 1997). Assim, um valor mais elevado de J_0 reflete um elevado grau de deformação elástica, o que indica que as cadeias de polipeptídios na rede são relativamente livres para reorganizar (MA et al., 1997). Em outras palavras, a compliância instantânea é inversamente proporcional à rigidez das amostras (OLIVARES et al., 2009; DANTAS et al., 2015).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os tratamentos e ao longo do tempo de estocagem para os parâmetros viscoelásticos avaliados. Todas as amostras de queijo Minas Frescal mostraram menores valores de J_0 que a maioria dos valores reportados na literatura, ou seja, maior rigidez quando comparada com os outros queijos, incluindo queijo Minas Frescal probiótico (DANTAS et al., 2015), queijo Minas Frescal com baixo teor de gordura (Cunha et al., 2006), queijo Cheddar (Ma et al, 1997) e queijo mussarela (Olivares et al., 2009). Para as amostras Vácuo, N_2 e Mistura o parâmetro J_0 apresentou uma tendência de decréscimo ao longo do tempo de estocagem o que indica um aumento em sua rigidez. Isso pode estar relacionado à possível perda de umidade ao longo do tempo de estocagem. As amostras CO_2 e Mistura apresentaram maior similaridade com o controle indicando uma maior conformidade destes tratamentos em relação ao controle. A amostra comercial apresentou menores valores de compliância

instantânea e viscosidade Newtoniana indicando maior grau rigidez das amostras. De forma geral todas as amostras apresentaram decréscimo nos valores de J_1 após o primeiro dia de estocagem o que corrobora o aumento da rigidez ao longo do tempo de estocagem conforme análise do parâmetro J_0 . Segundo Fritzen-Freire e colaboradores (2010b), o uso de ácido láctico contribui para a obtenção de um queijo com baixa resistência mecânica e, com isso, menor elasticidade. Além disso, o queijo com alto teor de umidade apresenta a tendência para ser mais viscoelástico que elástico. Por essa razão, os valores de J_1 apresentaram queda menos acentuada, se comparados aos valores de J_0 dos tratamentos após 21 dias de estocagem. O tempo de retardo não apresentou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos e com relação ao tempo de estocagem.

Tabela 7. Parâmetros de compliância estimados J_0 (compliância instantânea), J_1 (compliância viscoelástica), τ (tempo de retardo) e η_N (viscosidade Newtoniana) para as amostras de queijo Minas Frescal probiótico.

Amostra	Tempo (dias)	J_0 (10^{-12} Pa $^{-1}$)	J_1 (10^{-4} Pa $^{-1}$)	τ (s)	η_N (10^6 Pa.s)
Comercial	-	0,55 ± 0,56 ^a	4,81 ± 1,41 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,13 ^c
Controle	1	3,56 ± 3,58 ^{aA}	3,39 ± 0,16 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,80 ± 0,03 ^{aB}
	7	2,46 ± 1,69 ^{aA}	2,33 ± 0,26 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,02 ± 0,05 ^{bcAB}
	14	5,33 ± 7,29 ^{aA}	2,43 ± 0,13 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,08 ± 0,10 ^{bA}
	21	1,77 ± 1,84 ^{aA}	2,57 ± 0,44 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,00 ± 0,14 ^{bcAB}
CO ₂	1	3,56 ± 3,58 ^{aA}	3,39 ± 0,16 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,80 ± 0,03 ^{aB}
	7	3,59 ± 6,11 ^{aA}	2,72 ± 1,02 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,17 ± 0,28 ^{bA}
	14	4,10 ± 4,25 ^{aA}	3,07 ± 0,40 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,82 ± 0,01 ^{bB}
	21	0,70 ± 0,19 ^{aA}	2,56 ± 0,71 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,70 ± 0,03 ^{cdB}
Vácuo	1	3,56 ± 3,58 ^{aA}	3,39 ± 0,16 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,80 ± 0,03 ^{aB}
	7	0,86 ± 1,06 ^{aA}	1,83 ± 0,16 ^{bB}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,20 ± 0,12 ^{bA}
	14	0,32 ± 0,42 ^{aA}	2,20 ± 0,10 ^{bcAB}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,81 ± 0,03 ^{bB}
	21	0,32 ± 0,35 ^{aA}	3,40 ± 0,87 ^{abA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,79 ± 0,16 ^{cb}
N ₂	1	3,56 ± 3,58 ^{aA}	3,39 ± 0,16 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,80 ± 0,03 ^{aB}
	7	1,15 ± 0,88 ^{aA}	2,84 ± 0,44 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,77 ± 0,08 ^{cdB}
	14	1,43 ± 0,50 ^{aA}	3,17 ± 0,21 ^{abA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,94 ± 0,03 ^{bAB}
	21	1,55 ± 2,56 ^{aA}	2,66 ± 0,11 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,17 ± 0,09 ^{abA}
Mistura	1	3,56 ± 3,58 ^{aA}	3,39 ± 0,16 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	0,80 ± 0,03 ^{aC}
	7	2,24 ± 3,74 ^{aA}	1,83 ± 0,25 ^{bB}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,52 ± 0,10 ^{aB}
	14	2,66 ± 3,87 ^{aA}	0,65 ± 0,12 ^{cb}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	2,25 ± 0,37 ^{aA}
	21	0,46 ± 0,76 ^{aA}	0,81 ± 0,14 ^{cb}	0,10 ± 0,00 ^{Aa}	1,38 ± 0,08 ^{aB}

Média ± desvio padrão (n = 6). ^{a,b,c} As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tratamento. ^{A,B,C} As médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05) em relação ao tempo de estocagem. Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

De forma geral, as propriedades reológicas do queijo estão relacionadas à sua composição, microestrutura (arranjo estrutural de seus componentes), ao estado físico-químico e interações de seus componentes e de sua macroestrutura (presença de olhaduras, fissuras, etc) (FOX et al., 2000). Foram observados valores altos de desvio padrão nos parâmetros reológicos analisados que podem ser decorrentes da irregularidade da estrutura do queijo. No decorrer do período de estocagem as amostras de todos os tratamentos, inclusive na comercial, apresentaram fissuras. Estas fissuras estão relacionadas à formação de CO₂ proveniente do metabolismo bacteriano. Como o queijo foi avaliado segundo os requisitos higiênicos sanitárias, especialmente no que se refere aos coliformes, e apresentaram resultados satisfatórios conforme os requisitos da legislação (BRASIL, 2001), acredita-se que os pequenos orifícios foram formados a partir de gases provenientes de reações fermentativas de bactérias lácticas, como lactobacilos, lactococos e bactérias propiônicas a partir do ácido láctico. Estas olhaduras foram mais evidentes nas amostras com AM e a vácuo, uma vez que o gás produzido não podia se dissipar para a atmosfera da embalagem, ficando retido na massa do queijo. Como a massa do queijo fresco tem características viscoelásticas, a pressão do gás liberado forma um orifício (“olho”) e, dependendo da tensão de ruptura, a estrutura do queijo pode suportar a pressão sem se romper. Se a pressão do gás no orifício tornar-se maior que a tensão de ruptura, formam-se fraturas e fissuras na estrutura da massa (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

4.7 Avaliação sensorial

O teste de aceitação do queijo Minas Frescal probiótico e da amostra comercial foi realizado com 105 consumidores, sobre os quais o perfil está apresentado no ANEXO 3.

A Tabela 8 apresenta os resultados médios de aceitação na avaliação visual do produto embalado. Nota-se que houve uma pequena, porém, significativa preferência ($p < 0,05$) para o queijo acondicionado a vácuo. No entanto, nota-se que todas as amostras obtiveram notas referentes aos termos “gostei moderadamente e

gostei ligeiramente”. O fato da avaliação visual da embalagem a vácuo apresentar melhor aceitação, deve-se ao fato de que neste sistema de embalagem há menor percepção de sinérese no queijo, o que atribui melhor aparência ao produto.

Tabela 8. Médias e desvios padrão dos testes afetivos de avaliação visual e aceitação sensorial do queijo Minas Frescal probiótico estocado a $5\pm 1^\circ\text{C}$ e da amostra comercial.

Tratamento	Sistema de Embalagem					
	Visual	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global
Controle	6,13 ± 1,91 ^b	7,11 ± 1,33 ^a	6,56 ± 1,40 ^a	7,29 ± 1,08 ^a	6,79 ± 1,58 ^a	7,11 ± 1,17 ^a
CO₂	6,70 ± 1,42 ^{ab}	7,29 ± 1,24 ^a	6,51 ± 1,35 ^a	7,28 ± 1,11 ^a	7,00 ± 1,43 ^a	7,10 ± 1,11 ^a
N₂	6,50 ± 1,93 ^b	7,46 ± 1,08 ^a	6,52 ± 1,48 ^a	7,36 ± 1,23 ^a	7,11 ± 1,45 ^a	7,36 ± 1,04 ^a
Mistura	6,58 ± 1,76 ^{ab}	7,11 ± 1,44 ^a	6,34 ± 1,45 ^a	7,24 ± 1,31 ^a	6,80 ± 1,65 ^a	7,06 ± 1,22 ^a
Vácuo	7,14 ± 1,42 ^a	7,10 ± 1,47 ^a	6,49 ± 1,46 ^a	7,39 ± 1,28 ^a	6,99 ± 1,40 ^a	7,21 ± 1,19 ^a
Comercial	*	4,30 ± 2,04 ^b	5,30 ± 2,09 ^b	4,51 ± 2,19 ^b	4,92 ± 2,20 ^b	4,52 ± 2,06 ^b

Média ± desvio padrão (n = 3). ^{a, b} As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO₂ = amostras embaladas com gás carbônico; N₂ = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

*Não foi realizado o teste de aceitação visual do sistema de embalagem da amostra comercial.

Este resultado mostra-se de acordo com a Figura 9 que apresenta os resultados de intenção de compra do produto embalado. Observa-se que 33% dos consumidores certamente comprariam a amostra acondicionada a vácuo. Em relação à média das notas das avaliações, não houve diferença significativa ($p > 0,5$) entre as amostras com AM e a vácuo, porém, a amostra controle obteve nota significativamente menor ($p < 0,05$) se comparada às amostras a vácuo e com CO₂, sendo as médias das avaliações de 3,42 (controle), 3,79 (CO₂), 3,72 (N₂), 3,76 (mistura) e 4,03 (vácuo). O fato das avaliações das amostras a vácuo e com CO₂ não diferirem significativamente pode ser explicado, uma vez que após o envase com CO₂, em cerca de 7 dias, este gás era consumido, e, conseqüentemente, formava-se vácuo no espaço livre das embalagens destas amostras. Nota-se também na Figura 9 que entre 66% e 76% dos consumidores certamente ou

provavelmente comprariam as amostras com AM ou a vácuo, enquanto que para a amostra controle esta avaliação representou apenas 55% dos consumidores.

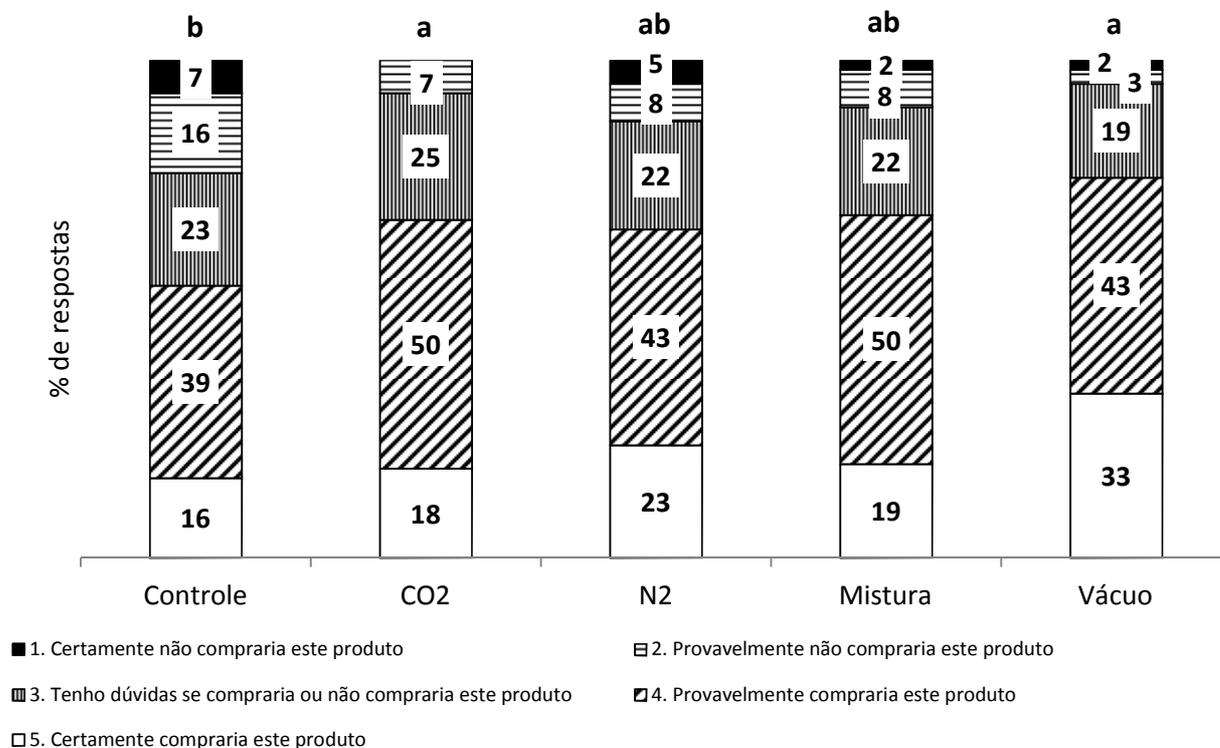


Figura 9. Intenção de compra baseada na avaliação visual do queijo Minas Frescal probiótico em diferentes sistemas de embalagem. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

Analisando a aceitação do queijo Minas Frescal probiótico, nota-se na Tabela 8 que apenas a amostra comercial apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) perante aos demais tratamentos no que se refere aos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. De maneira geral, as amostras tiveram boa aceitação, com notas próximas de 7 para todos os atributos avaliados, o que corresponde ao termo “gostei moderadamente”. Desta forma, podemos afirmar que os diferentes sistemas de embalagem não apresentaram influência nas características sensoriais do queijo Minas Frescal probiótico.

Com relação à intenção de compra dos queijos (Figura 10), mais de 70% dos consumidores certamente ou provavelmente comprariam as amostras com AM, a vácuo e controle. Entres estas amostras, não houve diferença significativa ($p>0,05$) em relação às notas dos consumidores, o que corresponderam a 4,11 (N_2), 4,04 (controle, CO_2 e vácuo) e 3,95 (mistura). Já a amostra comercial apresentou pouca aceitação, sendo que 62% dos consumidores certamente ou provavelmente não comprariam este produto, apresentando uma média de 2,28 ($p<0,05$).

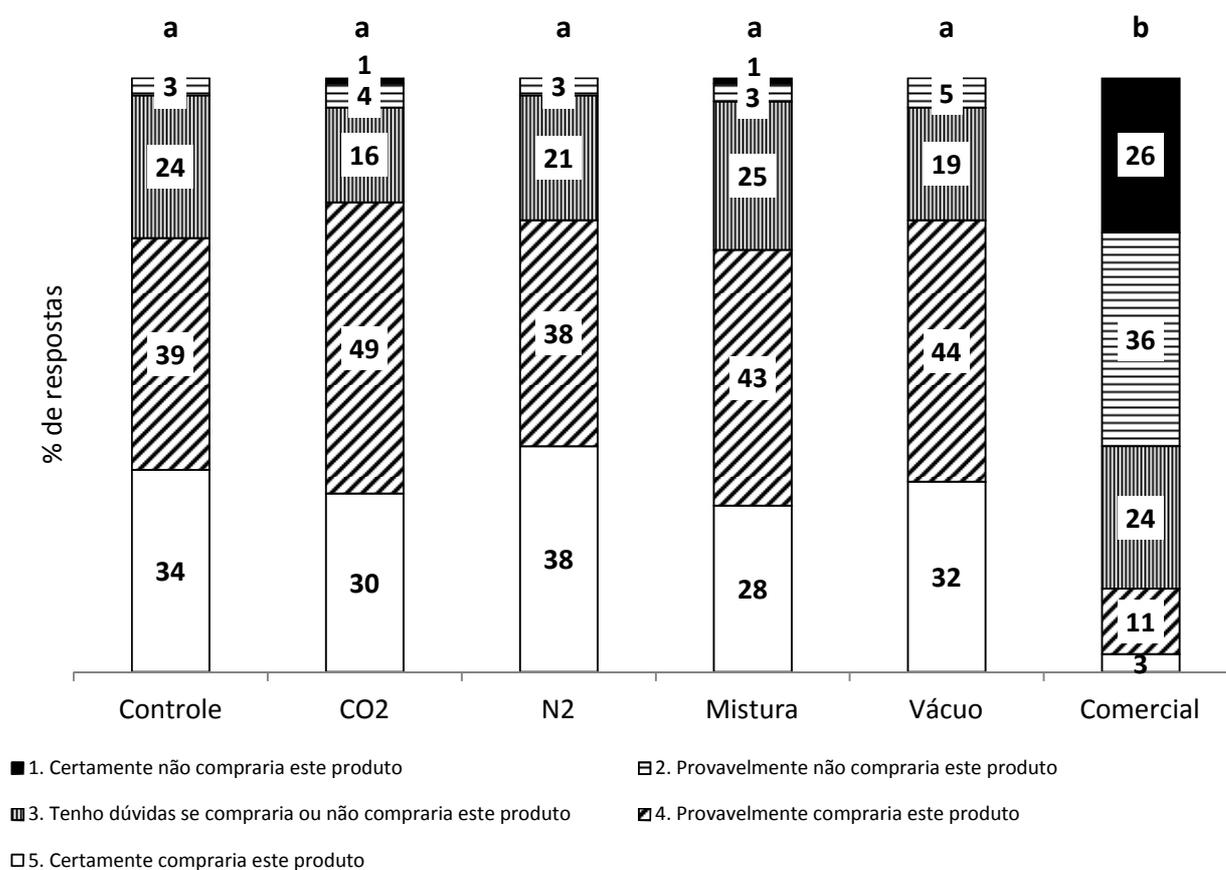


Figura 10. Intenção de compra das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO_2 = amostras embaladas com gás carbônico; N_2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

Mediante as análises físico-químicas da amostra comercial (acidez: 0,67 % e pH 4,85), justifica-se o resultado de ideal de gosto ácido apresentado na Figura 11, uma vez que 84% dos consumidores atribuíram as notas entre os termos

“ligeiramente mais ácido que o ideal” e “extremamente mais ácido que o ideal”, o que corresponde à nota média de 6,53 ($p < 0,05$). Com relação aos tratamentos estudados, entre 55 a 61% dos consumidores avaliaram como “ideal” a intensidade de gosto ácido dos queijos após 21 dias de estocagem refrigerada, sendo a média das notas dos tratamentos foram 4,87 (controle), 4,85 (CO_2), 4,93 (N_2), 4,80 (mistura) e 4,91 (vácuo). Embora a amostra controle tenha apresentado maior teor de acidez na análise físico-química (Tabela 4), esta diferença não foi percebida sensorialmente, já que apenas a amostra comercial apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) de ideal de gosto ácido, conforme mostra a Figura 11.

Para os resultados de ideal de textura apresentados na Figura 12, não houve diferença significativa entre os tratamentos com AM, a vácuo ou o controle. As notas médias para estas amostras foram 5,60 (controle), 5,44 (CO_2), 5,38 (N_2), 5,53 (mistura) e 5,37 (vácuo), o que corresponde ao critério de julgamento “ideal” para a textura dos queijos. No entanto, para a amostra comercial, a média das notas foi de 3,75, o que corresponde a “ligeiramente ou moderadamente menos consistente que o ideal”. Estes resultados estão de acordo com as análises reológicas, nos quais, a amostra comercial apresentou menor dureza, mastigabilidade e tensão de ruptura, indicando que era uma amostra menos consistente que os tratamentos estudados.

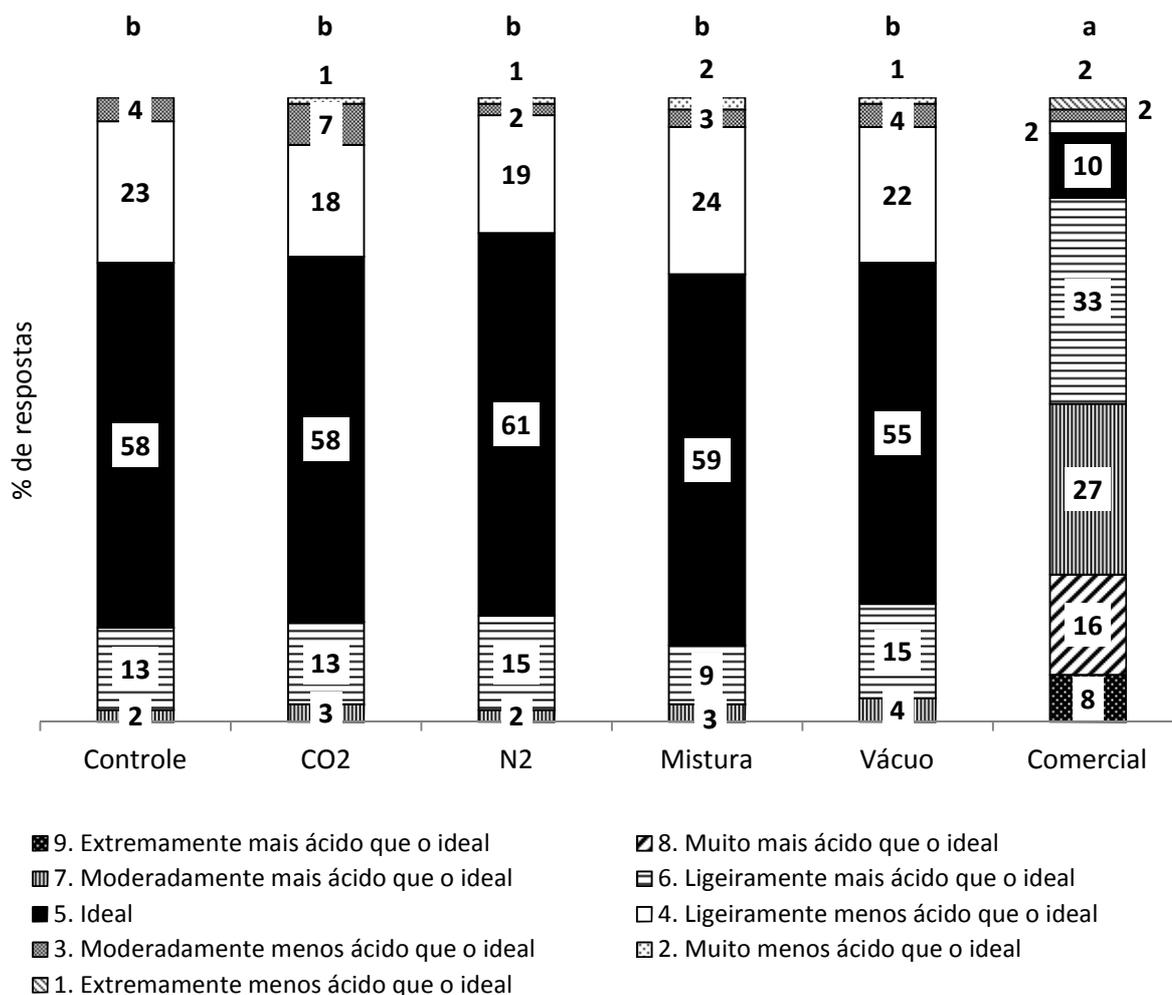


Figura 11. Ideal de gosto ácido das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

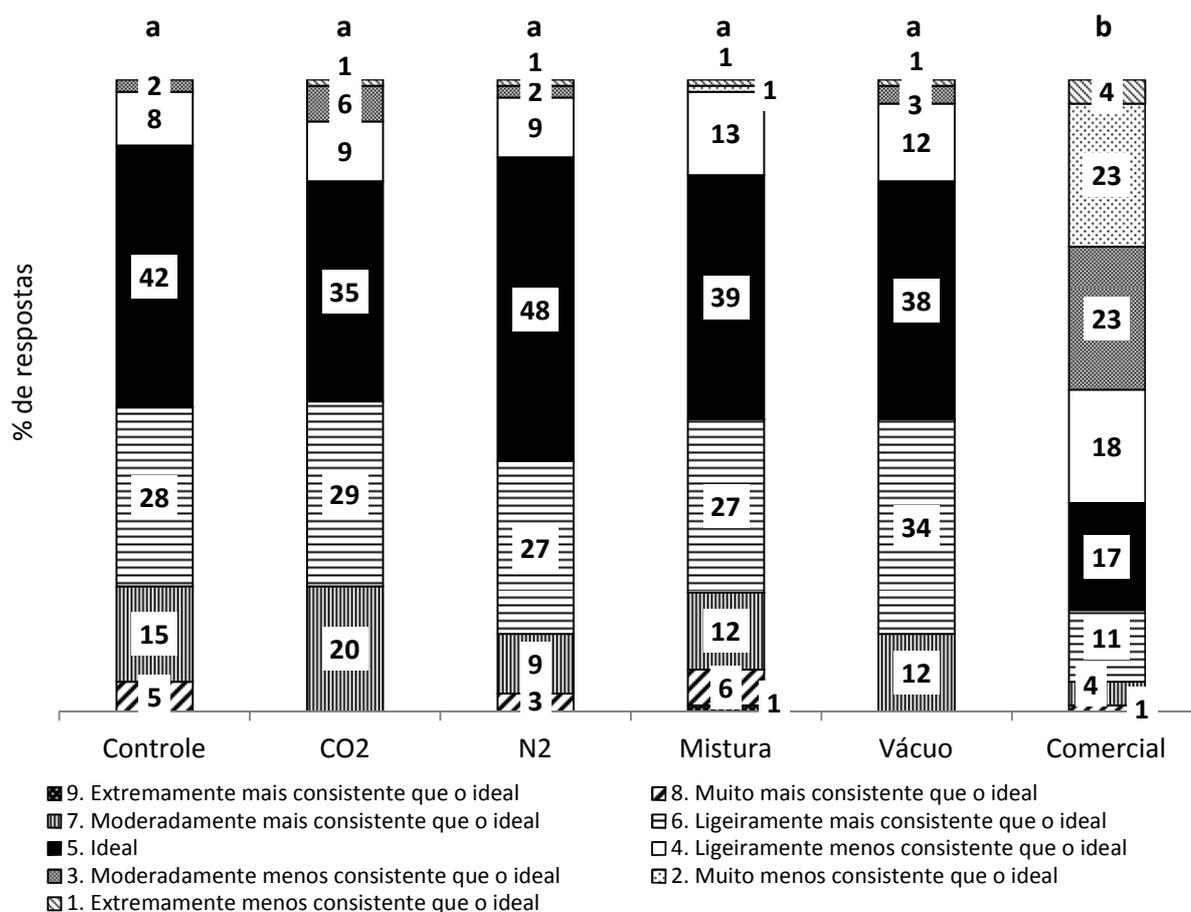


Figura 12. Ideal de textura das amostras de queijo Minas Frescal probiótico. ^{a, b} Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Comercial = amostras adquiridas comercialmente; Controle = amostras embaladas sem atmosfera modificada; Mistura = amostras embaladas com atmosfera composta por 1 gás carbônico : 1 nitrogênio; CO2 = amostras embaladas com gás carbônico; N2 = amostras embaladas com nitrogênio; Vácuo = amostras embaladas a vácuo.

5 CONCLUSÃO

Apesar de o queijo fresco ser considerado uma boa matriz para carrear bactérias probióticas, percebeu-se melhor desenvolvimento e manutenção da *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12[®]) quando presentes em queijos acondicionados em sistemas com supressão de oxigênio (a vácuo ou com atmosferas de CO₂ e N₂). Uma menor viabilidade da bactéria probiótica foi observada na amostra controle o que refletiu também na menor resistência às condições gastrointestinais.

As concentrações de ácidos orgânicos corresponderam ao desenvolvimento das bifidobactérias. Desta forma, houve aumento da concentração dos ácidos acético e láctico e diminuição do ácido cítrico nos tratamentos com AM e vácuo, em consequência da maior concentração de bactérias viáveis nessas amostras.

Considerando o queijo Minas Frescal um produto de vida útil curta, poucas alterações reológicas e de textura foram observadas. De maneira geral, não houve uma correlação significativa entre os resultados das características reológicas e de textura em relação aos sistemas de embalagem avaliados.

Também na avaliação sensorial, não houve diferença entre os tratamentos, de maneira que todos tiveram boa aceitação e intenção de compra. Apenas no que diz respeito à avaliação visual do queijo embalado, a amostra a vácuo apresentou melhor aceitação.

Contudo, a aplicação de um sistema de embalagem que permita preservar a estabilidade e as características funcionais do produto é algo indispensável na produção de alimentos probióticos. Especialmente quando se trata de um micro-organismo probiótico anaeróbio estrito, como a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, um sistema de embalagem com atmosfera modificada ou a vácuo aliado aos materiais de embalagens de alta barreira aos gases, como os laminados com alumínio, Nylon, EVOH ou PVdC, representam um importante recurso para a manutenção da viabilidade do micro-organismo probiótico durante o tempo de vida útil do produto, o que preserva sua característica de alimento funcional.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K.; GRUW, I.U.; MUSTAPHA, A.; FERNANDO, L.N.. Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurts during manufacture and refrigerated storage. *Journal of Food Quality*, v. 25, n. 5, p.435-451, nov. 2002.

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

ALVES, R.M.V.; SARANTOPOULOS, C.I.G.D.L; VAN DENDER, A.G.F.; FARIA, J.D.A. Stability of sliced mozzarella cheese in modified-atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*. 59, p. 838–844, 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard Test Method for Oxygen Transmission Rate Through Dry Packages Using a Coulometric Sensor. ASTM F1307-02. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard Guide for Determination of Thickness of Plastic Film Test Specimens. ASTM D6988-13. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. Washington, 2006.

ARAÚJO, P.F.; OKURA, M.H.; REZENDE, R.; JARDIM, F.B.B.; FINZER, J.R.D.; FRANZÉ, S.F. Influência da atmosfera modificada na composição de queijo Minas Frescal. *FAZU em Revista, Uberaba*, n.2, p.144-155, 2005.

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and Probiotic Action. In SALMIEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. CRC Press. 3 ed, cap 2, p 67-124, 2004.

BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. R.; PALMA, S. B.; SABBAG, N. G. ; ZALAZAR, C. A. Proteolytic activity of three probiotic strain in a semi-hard cheese as single and mixed

cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 467-475, 2009.

BIAVATI, B.; MATTARELLI, P. The Family Bifidobacteriaceae. *The Prokaryotes*, Springer Science + Business Media. p.322-382, 2006.

BOLDUC, M.P.; RAYMOND, Y.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C. P.; VUILLEMARD, J. C. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal*. 2006; 16: 1038–1048.

BOURNE, M.C. Texture profile analysis. *Food Technology*, v. 32, n. 7, pp. 62–66, 1978.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, v. 14, n. 5, p.375-387, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações 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: Nov. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal*, em 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de setembro de 2011. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal*, em 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, em 01 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, de 08 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, de 11 de março de 1996.

BRODY, A.L. El mercado. In: PARRY, R. T. Envasado de los alimentos em atmósfera modificada. Zaragoza: Acribia, 331 p. cap. 2, p. 32-55. 1995.

BURGERS, J. M.: Mechanical considerations-model systems-phenomenological theories of relaxation and of viscosity. First report on viscosity and plasticity. Nordemann Publishing Company New York. 1935.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas Fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, p.1279-1288, 2005a.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas Fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus Paracasei*. *LWT - Food Science and Technology*, v.38, p.173-180, 2005b.

ÇAGLAR, E; SANDALLI, N.; TWETMAN, S.; KAVALOGLU, S.; ERGENELI, S.; SELVI, S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand*, v. 63, n. 6, p.317-320, jan. 2005.

CAMPOS, A.C. Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento ácido mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal. Campinas, 2000. Dissertação

(Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. (Ed.). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York, USA: Springer Science+business Media, 2009. 1248 p.

CHURCH, I.J.; PARSONS, A.L. Modified Atmosphere Packaging Technology: A Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 67, p. 143-152, 1995.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science e Technology*, v.5, p.345-352, 1994.

CHURCH, F.C.; SWAISGOOD, H.E.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66, p.1219-1227, 1983.

CRITTENDEN, R. An Update on Probiotic Bifidobacteria. In SALMIEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press. 3 ed, cap. 3, p 125-158, 2004.

CRUZ, A. G.; CASTRO, W. F.; FARIA, J. A. F.; LOLLO, P. C. B.; AMAYA-FARFÁN, J.; FREITAS, M. Q.; RODRIGUES, D.; OLIVEIRA, C. A. F.; GODOY, H. T. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 5, p. 2261-2269, 2012.

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Queijos probióticos e prebióticos. In. SAAD; S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas*. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, p.85-104, 2011.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, n. 40, p. 951-956, 2007.

CUNHA, C.R.; VIOTTO, W.H.V.; VIOTTO, L.A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: effect on

composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal*, vol. 16, 3, p. 215-224, 2006.

DANIELS, J.A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S. S.H.. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48, 532, 1985.

DANTAS, A. B.; JESUS, V. F.; SILVA, R.; ALMADA, C. N.; ESMERINO, E. A.; CAPPATO, L. P.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, C. C.; SANT'ANA, A. S.; BOLINI, H. M.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus Casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, out. 2015. Doi: 10.3168/Jds.2015-9880.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001 . 676p.

FARKYE, N.Y.; VEDAMUTHU, E.R.. Microbiology of soft cheeses. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). *Dairy microbiology handbook*. 3. ed. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002. Cap. 10. p. 479-514.

FAVA, P.; PIERGIOVANNI, L. CO₂ solubility in foods packaged with modified atmosphere ii: correlation with some chemical–physical characteristics and composition. *Industrie Alimentari*, 31, 424–430, 1992.

FELICIO, T.L.; ESMERINO, E.A.; VIDAL, V.A.S.; CAPPATO, L.P.; GARCIA, R.K.A.; CAVALCANTI, R.N.; FREITAS, M.Q.; CONTE JUNIOR, C.A.; PADILHA, M.C.; SILVA, M.C.; RAICES, R.S.L.; ARELLANO, D.B.; BOLLINI, H.M.A.; POLLONIO, M.A.R.; CRUZ, A.G. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, v. 196, p.628-637, abr. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.102. Disponível em: <http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814615014545?httpAccept=text/xml>. Acesso: Nov. 2015.

FINNE, G. Modified and controlled atmosphere storage of muscle foods. *Food Technology*, v. 36, n.2, p. 128–133, 1982.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/.../a0512e00.pdf>. Acesso: Nov. 2015.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H.. Cheese rheology and texture. In FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H (Eds.). *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen, p. 305-340, 2000.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.B.M.O; LAURINDO, J.B.; AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. *International Journal of Dairy Technology*, v.63, n.4, p.561-568, 2010a.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Food Engineering*, v. 96, n. 4, p.621-627, fev. 2010b.

FUKUSHIMA, Y.; LI, S-T.; HARA, H.; TERADA, A.; MITSUOKA, T. Effect of Follow-Up Formula Containing Bifidobacteria (NAN BF) on Fecal Flora and Fecal Metabolites in Healthy Children. *Bioscience Microflora*, v. 16, n. 2, p.65-72, 1997.

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

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus Paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 4907-4916, 1998.

GENIGEORGIS, C. Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p. 237–251, 1985.

GILL, L.C.O.; TAN, K.H. Effect of CO₂ on the growth of meat spoilage bacteria. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 39, p.317–319, 1980.

GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A.; KRABSHUIS, J.; MAIR, T. L.. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation*, 22 p. 2008.

GUNASEKARAN, S.; AK, M.M.. *Cheese Rheology and Texture*. Florida, USA: CRC Press, 2002. 456 p.

HELLER, K.J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. In: FARNWORTH, Edward R. (Ed.). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Florida, USA: Crc Press, 2003. p. 203-225.

HERNANDEZ, R. J.. Food Packaging Materials, Barrier Properties, and Selection. In: VALENTAS, Kenneth J.; ROTSTEIN, Enrique; SINGH, R. Paul (Ed.). *Handbook of food engineering practice*. Florida, USA: CRC Press, 1997. Cap. 8, p. 736.

HINTLIAN, C.B.; HOTCHKISS, J.H. The safety of modified atmosphere packaging – a review. *Food Technology*. 40, 70–76, 1986.

HOTCHKISS, J.H.; BANCO, M.J. Influence of new packaging technologies on the growth of microorganisms in produce. *Journal of Food Protection*, 55, 815, 1992.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. BIFIDOBACTERIA: RESEARCH and development in Japan. *FOOD TECHNOL*. 47:129-134. 1993.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: a review. *Journal of Muscle Foods*. 13, p.143–168, 2002.

JALILI, H.; RAZAVI, H.; SAFARI, M.. Effect of whey permeate and yeast extract on metabolic activity of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12 cultivated in skim

milk based media. Iranian Journal of Biotechnology, Karaj, I.R. Iran, v. 8, n. 1, p.38-45, jan. 2010.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711 p.

JAY, J. M.. Modern Food Microbiology. 6. ed. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 2000. 635 p.

KAWASAKI S, NAGASAKU M, MIMURA T, KATASHIMA H, IJYUIN S, SATOH T, NIIMURA Y. Effect of CO₂ on colony development by Bifidobacterium species. Applied and Environment Microbiology, 73,p. 7796–7798, 2007.

KIMURA K, MCCARTNEY AL, MCCONNELL MA, AND TANNOCK GW. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 3394–3398.

LAW, B.A. Technology of cheesemaking. CRC, Boca Raton. 322p. 1999.

LEE, Y. K. Probiotic Microorganisms. In: LEE, Yuan Kun; SALMINEN, S. (Ed.). Handbook of probiotics and prebiotics. 2. ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009a. Cap. 1. p. 3-4.

LEE, Y. K. Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In: LEE, Yuan Kun; SALMINEN, Seppo (Ed.). Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2. ed. New Jersey, United States Of America: John Wiley & Sons, Inc., 2009b. Cap. 2. p. 179-184.

LEITE & DERIVADOS. São Paulo, Brasil: Bts Informa, n. 152, jan/fev. 2015. Disponível em: <http://issuu.com/btsinforma/docs/152_alta/1?e=0/11577403>. Acesso em: Out. 2015.

LISERRE, A.M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B.D.G.M.. Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Biotechnology, v. 21, n. 1, p.1-16, 6 mar. 2007.

MA, L., DRAKE, M. A., BARBOSA-CANOVAS, G. V., & SWANSON, B. G.. Rheology of full-fat and low-fat Cheddar Cheeses as related to type of Fat Mimetic. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 4, p. 748–752, 1997.

MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF., K.; VALLIS; L. V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, v.4, p.129-148, 1989.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*. 15, p. 921–927, 2005.

MAGANHA, L. C.; ROSIM, R. E.; CORASSIN, C. H.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; OLIVEIRA, C. A. F.. Viability of probiotic bacteria in fermented skim milk produced with different levels of milk powder and sugar. *International Journal of Dairy Technology*, v. 67, n. 1, p.89-94, 12 jul. 2013.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; STEPHAN, M. P.; EGITO, A. S.; DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. *Food Control*, v. 45, p.22-28, nov. 2014.

MARSILI, R. T.; OSTAPENKO, H.; SIMMONS, R. E.; GREEN, D. E.. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products .*Journal of Food Science*, v.46, 1981.

MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILAN, C.G.; SANCHEZ, B.; GUEIMONDE, M. Bifidobacterium. In *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. LIU, D. (ed). CRC Press. cap. 5, p. 45-57, 2011.

MASCO, L.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 221, 2005.

MASUDA, T.; YAMANARI, R.; ITOH, T. The Trial for Production of Fresh Cheese Incorporated Probiotic *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria. *Milchwissenschaft*, v.60, n.2, p.167-171, 2005.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton: CRC Press. p. 218, 1999.

MILLER, C.W.; NGUYEN, M.H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The influence of packaging materials on the dissolved oxygen content of probiotic yoghurt. *Packaging Technology and Science*.15, p. 133–138, 2002.

MOZZI, F.; GERBINO, E.; FONT DE VALDEZ, G.; TORINO M. I. Functionality of hexopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 56–64, 2009.

OECD/FAO. OECD Agriculture Statistics (database). World dairy projections: butter and cheese, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-table63-en. Acesso: Nov. 2015.

OLIVARES, M.L.; ZORRILLA, S.E.; RUBIOLO, A.C.. Rheological properties of mozzarella cheese determined by creep/recovery tests: Effect of sampling direction, test temperature and ripening time. *Journal of Texture Studies*, v. 40, n. 3, p.300-318, jun. 2009.

OLIVEIRA, L.M.; Sarantópoulos, C.I.G.L.; Cunha, D.G.; Lemos, A.B.. Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Campinas, SP, v. 16, n. 3, p.202-210, 2006.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, vol. 16, 5, p. 446-456, 2006.

PARRY, R.T. *Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods*. New York: Blackie Academic & Professional Publishers. p 305,1993.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, v.14, p.505–515, 2004.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 13, p. 3-11, 2002.

RAY, B. *Fundamental Food Microbiology*. 3 ed. New York, USA: CRC Press, 2005. 608p.

ROBINSON, R.K.; LTSARANUWAT, P. The microbiology of concentrated and dried milks. In: ROBINSON, Richard K. (Ed.). *Dairy microbiology handbook*. 3. ed. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2002. Cap. 5. p. 175-212.

SAARELA, M. Methods to improve the viability and stability of probiotics. In: SAARELA, Maria (Ed.). *Functional Dairy Products*. Cambridge, England: CRC Press, 2007. v. 2. Cap. 18. p. 391-403.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3 ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 2004. 798 p.

SANTOS, B. A.; CAMPAGNOL, P. C. B.; CAVALCANTI, R. N.; PACHECO, M. T. B., NETTO, F. M.; MOTTA, E. M. P.; CELEGUINI, R. M. S.; WAGNER, R.; POLLONIO, M. A. R. Impact of sodium chloride replacement by salt substitutes on the proteolysis and rheological properties of dry fermented sausages. *Journal of Food Engineering*, v. 151, p.16-24, abr. 2015.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, v.17, p.1284-1289, 2007.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. 3 ed. Campinas: CETEA/ITAL, 2002, 267 p.

SAXELIN, M. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market and changes in the market place: a European perspective. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p. 76-79, 2008.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: MAZZA, G., ed. *Handbook of Fermented Functional Foods*. Boca Ranton: CRC Press, p. 27–58, 2003.

TALWALKAR, A.; MILLER, C. W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. H.. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, n.6, p. 605-611, 2004.

TAMIME, A. Y. Microbiology of starter cultures. In: ROBINSON, Richard K. (Ed.). *Dairy microbiology handbook*. 3. ed. New York, Usa: John Wiley And Sons, Inc., 2002. Cap. 7. p. 261-366.

VINDEROLA, G.; BURNS, P.; RENHEIMER, J. Technology and stability of probiotics in probiotic and prebiotic cheeses. In SHAH, N. P.; DA CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (eds.) - *Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to human health*. Series: *Advances in food safety and food microbiology*, Nova Science Publishers Inc, chapter 14, pp. 365-404, 2011.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, T. D.; REINHEIMER, J. A.. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non-probiotic microflora in Argentinian fresco cheese, *Journal of Dairy Science*, 83, 1905–1911, 2000.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J.. *Dairy Science and Technology*. 2. ed. Florida, USA: Taylor & Francis Group, 2006. 763 p.

YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. Microbial stress adaptation and food safety. Florida, USA: Crc Press Llc, 2002. 384 p.

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABILIDADE DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO EM SISTEMAS DE EMBALAGEM COM ATMOSFERA MODIFICADA

Pesquisador: Simone Faria Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11335412.3.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Engenharia de Alimentos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 183.058

Data da Relatoria: 18/12/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto trata do uso de embalagens com atmosfera modificada para preservação da qualidade do queijo minas frescal probiótico. Alimento probiótico é o que contém micro-organismos vivos, como o Bifidobacterium BB-12, que conferem benefícios à saúde. O Bifidobacterium BB-12 é um micro-organismo anaeróbico, sendo necessário o uso de sistemas de embalagem que impeçam o contato do produto probiótico com o oxigênio. O projeto se propõe avaliar parâmetros físico-químicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais de queijo Minas Frescal probiótico embalado com três diferentes combinações de gases (O₂, CO₂ e N₂) e a vácuo. As amostras serão armazenadas a 5°C durante 28 dias. A estabilidade será avaliada através das análises físico-químicas (pH, acidez titulável, umidade, proteólise e cor), microbiológica (viabilidade da cultura probiótica na estocagem e nas condições do trato gastrointestinal), reológicas (creep test e compressão axial), quantificação de produtos metabólicos das culturas microbianas (ácido acético e ácido láctico) e análise sensorial (teste de aceitação).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a estabilidade do queijo Minas Frescal probiótico em sistemas de embalagem com atmosfera modificada.

Objetivos Secundários:

1) Avaliar a influência dos sistemas de embalagem com atmosfera modificada nos parâmetros físico-químicos, reológicos e sensoriais do queijo Minas Frescal probiótico;

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



2) Avaliar a influência de cada composição gasosa e do vácuo na taxa de crescimento do micro-organismo *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* durante 28 dias de estocagem refrigerada;

3) Avaliar a viabilidade do *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal após o período de estocagem;

4) Avaliar as alterações da composição gasosa no interior da embalagem durante a estocagem.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O pesquisador informa que não existe risco ao consumidor porque tanto o leite quanto o queijo serão avaliados quanto aos padrões microbiológicos da legislação brasileira. Serão utilizadas cepas comerciais da bactéria probiótica.

Benefícios: O pesquisador ressalta que a ingestão frequente de micro-organismos probióticos e na quantidade recomendada, poderá contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está redigido de maneira ordenada, com fundamentação teórica e objetivos bem definidos. A metodologia proposta está apresentada de forma detalhada assim como os métodos de análise estatística dos resultados. Além do projeto, a pesquisadora anexou o projeto de qualificação (completo). Serão avaliados 360 sujeitos que serão divididos em três grupos de 120 cada. Seguem-se os critérios de inclusão e de exclusão:

Critérios de Inclusão:

Antes da realização do teste, os consumidores serão solicitados a preencher um questionário de recrutamento e a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido. Serão selecionados apenas os consumidores que atenderem aos seguintes requisitos: ter mais de 18 anos; assinar o termo de consentimento livre e esclarecido; ser consumidor de queijo Minas Frescal e declarar não ser alérgico a qualquer dos ingredientes do queijo.

Critérios de Exclusão:

Não serão selecionados os consumidores que apresentarem as seguintes características: ser menor de 18 anos; não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido; não ser consumidor de queijo Minas Frescal e declarar ser alérgico a qualquer dos ingredientes do queijo.

Foi apresentado cronograma das atividades previstas. Não foi apresentado o orçamento do projeto. Foi indicado como orçamento/ fonte de recursos a bolsa de estudo da pesquisadora.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está completa e corretamente preenchida. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está redigido em linguagem acessível e contém informação acerca de todos os aspectos requeridos.

Recomendações:

Lembramos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 196/96 CNS/MS, artigo IV.2 "d").

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa, folha de rosto e TCLE adequados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 07 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

AVALIAÇÃO DO ASPECTO VISUAL DO SISTEMA DE EMBALAGEM

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo 05 amostras codificadas de queijo Minas frescal probiótico em **diferentes condições de embalagens**. Por favor, avalie cada uma das amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque na tabela o nº da amostra e a posição da escala que melhor reflita seu julgamento.

AMOSTRA	NOTA

- | | |
|--|--|
| <p>9. Gostei extremamente
8. Gostei muito
7. Gostei moderadamente
6. Gostei ligeiramente
5. Não gostei nem desgostei</p> | <p>4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei moderadamente
2. Desgostei muito
1. Desgostei extremamente</p> |
|--|--|

Por favor, indique qual sua intenção de compra em relação ao produto:

AMOSTRA	NOTA

- 5 - Certamente compraria este produto
4 - Provavelmente compraria este produto
3 - Tenho dúvidas se compraria ou não compraria este produto
2 - Provavelmente não compraria este produto
1 - Certamente não compraria este produto

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo 06 amostras codificadas de **QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO**. Por favor, avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra, utilizando a escala abaixo:

AMOSTRA	APARÊNCIA	AROMA	SABOR	TEXTURA	IMPRESSÃO GLOBAL

- 9. Gostei extremamente
- 8. Gostei muito
- 7. Gostei moderadamente
- 6. Gostei ligeiramente
- 5. Não gostei nem desgostei

- 4. Desgostei ligeiramente
- 3. Desgostei moderadamente
- 2. Desgostei muito
- 1. Desgostei extremamente

Prove as amostras e, utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **intensidade do GOSTO ÁCIDO** de cada uma delas.

AMOSTRA	NOTA

- 9. Extremamente mais ácido que o ideal
- 8. Muito mais ácido que o ideal
- 7. Moderadamente mais ácido que o ideal
- 6. Ligeiramente mais ácido que o ideal
- 5. Ideal

- 4. Ligeiramente menos ácido que o ideal
- 3. Moderadamente menos ácido que o ideal
- 2. Muito menos ácido que o ideal
- 1. Extremamente menos ácido que o ideal

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO MINAS FRESICAL PROBIÓTICO

Prove as amostras e, utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a **TEXTURA** de cada uma delas.

AMOSTRA	NOTA

- | | |
|---|--|
| 9. Extremamente mais consistente que o ideal | 4. Ligeiramente menos consistente que o ideal |
| 8. Muito mais consistente que o ideal | 3. Moderadamente menos consistente que o ideal |
| 7. Moderadamente mais consistente que o ideal | 2. Muito menos consistente que o ideal |
| 6. Ligeiramente mais consistente que o ideal | 1. Extremamente menos consistente que o ideal |
| 5. Ideal | |

Por favor, indique qual sua **intenção de compra** em relação ao produto:

AMOSTRA	NOTA

- 5 - Certamente compraria este produto
- 4 - Provavelmente compraria este produto
- 3 - Tenho dúvidas se compraria ou não compraria este produto
- 2 - Provavelmente não compraria este produto
- 1 - Certamente não compraria este produto

ANEXO 3

Tabela 9. Perfil dos consumidores participantes da Avaliação Sensorial do queijo Minas frescal probiótico submetido a diferentes sistemas de embalagem.

Atributo	Frequência (%)
Faixa Etária	
15-19 anos	13
20-30 anos	74
31-40 anos	8
>40 anos	6
Gênero	
Masculino	44
Feminino	56
Escolaridade	
Ensino médio completo	2
Ensino superior	59
Pós-graduação	39
Consumo de Queijo Minas	
Diário	13
Semanal	32
Mensal	19
Menos que 1 vez ao mês	36
Consumo de Alimentos Probióticos	
Diário	17
Semanal	23
Mensal	25
Menos que 1 vez ao mês	25
Não consome	9
Já consumiu queijo Minas Probiótico?	
Sim	18
Não	82
Critérios que influenciam na decisão de compra	
	*
Aparência	78
Preço	56
Benefícios à saúde	54
Marca	18
Valor calórico	16

*porcentagem referente ao número de vezes em que o critério foi citado