



UNICAMP

ANA LAURA TIBÉRIO DE JESUS

**REDUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO EM QUEIJO COTTAGE
PROBIÓTICO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E ACEITAÇÃO SENSORIAL**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA LAURA TIBÉRIO DE JESUS

**REDUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO EM QUEIJO COTTAGE
PROBIÓTICO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E ACEITAÇÃO SENSORIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANA LAURA
TIBÉRIO DE JESUS, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
JOSÉ DE ASSIS FONSECA FARIA.

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

J499r Jesus, Ana Laura Tiberio de, 1981-
Redução de cloreto de sódio em queijo cottage probiótico : características físico-químicas, microbiológicas e aceitação sensorial / Ana Laura Tiberio de Jesus. – Campinas, SP : [s.n.], 2014..

Orientador: José de Assis Fonseca Faria.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probióticos. 2. Sal. 3. *Lactobacillus acidophilus*. 4. Cloreto de potássio. I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Reduction of sodium chloride in probiotic cottage cheese: physical-chemical and microbiological characteristics and sensory acceptance

Palavras-chave em inglês:

Probiotics

Salt

Lactobacillus acidophilus

Potassium chloride

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

José de Assis Fonseca Faria [Orientador]

Adriano Gomes da Cruz

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Data de defesa: 04-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

Orientador

Universidade Estadual de Campinas DTA/FEA

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Membro Titular

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro/IFRJ

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Membro Titular

Instituto de Tecnologia de Alimentos/TECNOLAT

Dra. Leila Maria Spadoti

Membro Suplente

Instituto de Tecnologia de Alimentos/TECNOLAT

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana

Membro Suplente

Universidade Estadual de Campinas DCA/FEA

Resumo Geral

O sódio é um elemento essencial na alimentação, contudo, o seu consumo em excesso poderá ter efeitos nocivos para a saúde, tais como o aumento da pressão sanguínea e a redução da absorção de cálcio. Devido a esses efeitos, a redução do teor de sódio nos alimentos tem sido uma das prioridades nas campanhas realizadas por órgãos governamentais, nomeadamente no setor de laticínios, onde o queijo é considerado um gênero alimentício com elevados níveis deste elemento. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar o efeito da substituição parcial de NaCl por KCl e MgCl₂, nos parâmetros de qualidade do queijo cottage probiótico, durante 28 dias de estocagem refrigerada e verificar a viabilidade da cultura *starter* e das culturas probióticas utilizadas para o processamento do queijo. Além disso, objetivou-se avaliar a aceitação sensorial para identificar direções para a melhoria de atributos sensoriais do produto perante os consumidores. Com base nos resultados obtidos, observou-se que o ideal de gosto salgado para o queijo cottage probiótico com NaCl foi de 1,12% (p/p), e as concentrações equivalentes em salinidade para todos os sais hipossódicos avaliados, mantiveram-se as mesmas do NaCl (1,12% p/p). As contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* variaram de 7,74 a 6,20 e 8,58 a 7,93 log (UFC. g⁻¹), respectivamente, no primeiro e no último dia de estocagem, valores esses suficientes para benefícios à saúde humana. Porém, as contagens da cultura *starter* permaneceram baixas e com valores inferiores a 3,0 log UFC. g⁻¹ para todas as formulações. Com relação aos ácidos orgânicos, o ácido láctico foi o mais encontrado em todas as formulações, seguido pelo ácido cítrico e ácido acético. Quanto à atividade proteolítica, os resultados demonstraram que a formulação controle (100% p/p de NaCl sem probióticos) foi a que apresentou menor atividade durante 28 dias de estocagem refrigerada, diferindo estatisticamente das demais formulações. Com bases nesses resultados, todos os queijos podem ser classificados como de baixo teor de gordura, (4.33 a 4.69 %), e muito alta umidade (74.60 a 75.59 %), segundo a legislação brasileira. A adição de culturas probióticas e a redução de sódio não provocaram mudanças significativas no perfil de ácidos graxos em todos os queijos formulados. Os

resultados demonstraram que todas as formulações de queijo cottage apresentaram potencial probiótico, desde que consumidas numa quantidade adequada (2 porções diárias de 50 g), uma vez que as concentrações dos probióticos permaneceram dentro dos padrões estipulados pela legislação brasileira. Entre as formulações elaboradas com sais hipossódicos, a formulação mais aceita foi aquela com redução de sódio de 25% (p/p) de NaCl e substituição por KCl (12,5% p/p) e MgCl₂ (12,5% p/p), e o atributo que mais afetou a aceitação dessas formulações foi a textura das amostras. Dessa forma, o queijo cottage probiótico demonstrou ser uma excelente matriz para inserção de sais hipossódicos, pois o poder de salga dos desses sais não é alterado em relação ao NaCl, sendo uma excelente alternativa para dietas com restrição de sódio.

Palavras-chave: • probióticos • sal hipossódico • *Lactobacillus acidophilus* • cloreto de potássio • estimativa de magnitude.

Abstract

Sodium intake is essential for the welfare of human being, however, its overconsumption may lead to unhealthy effects, namely increased blood pressure and lower calcium absorption. Due to the aforementioned effects, sodium content in food is one of the main focuses of attention in campaigns by government agencies, especially in the dairy sector where cheese is perceived as being a food with high sodium content. Thus, this study aimed to evaluate the effect of partial replacement of NaCl by KCl and MgCl₂ on the parameters of quality probiotic cottage cheese during 28 days of refrigerated storage and to determine the viability of starter culture and probiotic cultures used in cheese processing. Furthermore, the objective was to evaluate the sensory acceptance to identify directions for improving the sensory attributes of the product before consumption. Using magnitude estimation method, the salty flavor in probiotic cottage cheese was generated using 1.12% (w/w) NaCl, and equivalent concentrations in salinity for all low-sodium salts, was the same as for NaCl (1.12% w/w). The counts of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ranged from 7.74 to 6.20 and from 8.58 to 7.93 log (CFU. g⁻¹), respectively in the first and last day of storage, such values enough for benefits to human health. However, the starter culture counts remained at values below 3.0 log CFU. g⁻¹ for all formulations. Lactic acid was the organic acid found in greater quantities in all formulations, followed by citric acid and acetic acid. The proteolytic activity results showed that the control formulation (100% w/w NaCl without probiotics) showed the lowest activity during 28 days of refrigerated storage, differing from the other formulations. All cheeses tested can be classified as low-fat, (4.33 to 4.69%) and very high humidity (74.6 to 75.59%), according to Brazilian regulations. The addition of probiotic cultures and reduced sodium did not cause significant changes in the fatty acid profile of all tested cheeses. The results showed that all the formulations showed probiotic potential, if consumed in appropriate portion (2 portions of 50 g daily), since the concentration of probiotics remained within the Brazilian standards. Among formulations prepared with low-sodium salt, the best one was that with 25% (w/w) sodium reduction, KCl (12.5% w/w) and MgCl₂

(12.5% w/w); and the attribute that most affected the acceptance was the texture of the samples. Thus, the probiotic cottage cheese proved to be an excellent matrix for the insertion of low-sodium salts, because it does not change the power of brining in relation to NaCl.

Keywords: • *probiotics* • *low-sodium salt* • *Lactobacillus acidophilus* • *potassium chloride* • *magnitude estimation*

Sumário

Ficha catalográfica.....	iv
Banca Examinadora	v
Resumo Geral	vii
Abstract	ix
Sumário	xi
Dedicatória	xv
Agradecimentos.....	xvii
Introdução.....	1
Introdução Geral.....	3
Referências Bibliográficas	5
Capítulo 1	7
Revisão Bibliográfica e Objetivos	7
1.1 Alimentos funcionais.....	9
1.2 Probióticos.....	10
1.2.1 Benefícios à saúde.....	11
1.3 Mercado de produtos probióticos	13
1.4 Culturas probióticas.....	14
1.4.1 O gênero <i>Lactobacillus</i>	15
1.4.2 O gênero <i>Bifidobacterium</i>	17
1.5 Queijos probióticos.....	18
1.6 Redução de sódio	19
1.6.1 Sais hipossódicos.....	23
1.7 Queijo e redução de sódio.....	25
1.8 Queijo Cottage	27
1.9 Objetivos	29
1.10 Referências Bibliográficas	30
Capítulo 2	45
Estudo do poder de salga de sais hipossódicos em queijo Cottage adicionado de bactérias probióticas: ideal de gosto salgado, estimativa de magnitude e aceitação sensorial	45

Resumo	47
2.1 Introdução	49
2.2 Materiais e Métodos	50
2.2.1 Culturas empregadas	51
2.2.2 Processamento de queijo Cottage	51
2.2.3 Determinação da intensidade ideal de gosto salgado	54
2.2.4 Determinação da equivalência de gosto salgado	55
2.2.5 Análise de aceitação	57
2.2.6 Análise de penalidades (<i>Penalty analysis</i>)	58
2.2.7 Avaliação da viabilidade das culturas <i>starter</i> e das culturas probióticas	59
2.3 Resultados e Discussão	60
2.3.1 Determinação da intensidade ideal de gosto salgado	60
2.3.2 Determinação da equivalência de gosto salgado	62
2.3.3 Análise de aceitação	69
2.3.4 Mapa de preferência interno.....	73
2.3.5 Escala do ideal (<i>Just About Right</i>) e análise de penalidades (<i>Penalty Analysis</i>).....	75
2.3.6 Avaliação da viabilidade das culturas <i>starter</i> e das culturas probióticas	87
2.4 Conclusões.....	92
2.5 Referências Bibliográficas	93
Capítulo 3	101
Queijo Cottage Probiótico Reduzido de Sódio: Aspectos Físico- Químicos, Microbiológicos e Perfil de Textura.....	101
Resumo	103
3.1 Introdução	105
3.2 Material e Métodos.....	106
3.2.1 Elaboração de queijo Cottage probiótico reduzido de sódio.....	106
3.2.2 Contagem seletiva das culturas	108
3.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)	108

3.2.4	Produção de metabólitos pelas culturas microbianas	109
3.2.5	Avaliação da atividade proteolítica	110
3.2.6	Composição centesimal e análise de minerais.....	110
3.2.7	Perfil de ácidos graxos	110
3.2.8	Análise de textura instrumental (TPA)	111
3.2.9	Análise estatística	111
3.3	Resultados e Discussão	112
3.3.1	Contagem seletiva das culturas	112
3.3.2	pH.....	114
3.3.3	Produção de metabólitos pelas culturas microbianas	116
3.3.4	Avaliação da atividade proteolítica	118
3.3.5	Análise dos minerais.	121
3.3.6	Composição centesimal.	123
3.3.7	Perfil de ácidos graxos	125
3.3.8	Análise de textura instrumental (TPA).....	128
3.4	Conclusões.....	132
3.5	Referências Bibliográficas	133
	Conclusões Gerais	141
	Sugestões para Trabalhos Futuros.....	142
	Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	143
	Anexo B: Ficha do Teste de Consumidor	145
	Anexo C: Ficha do Teste Escala do Ideal.....	148

Dedicatória

Dedico mais esta conquista a Deus em primeiro lugar, aos meus pais Jaime e Cida, aos meus irmãos Jaime Filho (Jaiminho) e Lauro (Ticolé), à minha Tia Ana Maria Tibério e à minha querida vó Laura, por estarem sempre ao meu lado e encherem a minha vida de amor e felicidade.

“Maria passa na frente”

"Nunca deixe ninguém dizer que você não pode fazer alguma coisa. Se você tem um sonho, tem que correr atrás dele. As pessoas não conseguem vencer e dizem que você também não vai vencer. Se você quer alguma coisa, corre atrás."

À procura da felicidade.

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, por me guiar pelos caminhos certos, abençoando e iluminando minha vida.

Aos meus pais, Jaime e Cida, que sempre me incentivaram a estudar e tiveram sempre muito amor e paciência, sendo meus exemplos de vida. Meu pai o homem mais honesto que eu conheço. Minha mãe a mulher mais digna e incansável que existe. Todas as minhas conquistas são mérito de vocês e tudo que eu fizer não será a metade do que vocês já fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Jaiminho (sempre o melhor em tudo o que faz. Eu sigo os seus passos) e Ticolé (meu engenheiro favorito e meu amorzinho), agradeço por todo o amor, compreensão, ajuda em todos os momentos e por serem meus exemplos de profissionais. Sou fã de vocês.

À minha querida vó Laura, por todo amor, paciência, apoio, ajuda e torcida.

À minha amada Tia Ana Maria Tibério (minha gordinha), por estar sempre presente em minha vida, incentivando, apoiando e ajudando em momentos difíceis e alegrando a casa em dias de festa.

Aos meus primos Oswaldinho e Sueli, juntamente com os priminhos Taynah, Elisa e Davi, por terem me recebido tão bem aqui em Campinas logo que eu cheguei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria, por ter me dado essa oportunidade e ter confiado no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz ("*Boss*"), pela ajuda, paciência (mais do que nunca rsss), por ter confiado no meu trabalho desde o dia da entrevista do processo seletivo. Obrigada pelos artigos, pelos puxões de orelha, amizade e incentivo.

Aos membros da banca, Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá (ITAL/TECNOLAT), Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (UNICAMP/FEA/DCA) e Dra. Leila Maria Spadoti (ITAL/TECNOLAT) pelas valiosas contribuições e sugestões.

À Alice, técnica do laboratório de embalagens, por toda a ajuda e atenção durante todos os momentos no laboratório.

À Profa. Dra. Helena Bolini (UNICAMP/FEA/DEPAN) e toda equipe do laboratório de análise sensorial (Erick, Iza, Sandrinha, Lia, Natália, Ju Burger) pela colaboração na realização das análises sensoriais.

À Glaucia Carielo (DEPAN) pela ajuda fundamental na seleção dos meios de cultura para crescimento do probióticos.

A todos os provadores pela dedicação, paciência e disposição para realização dos testes, sem os quais não seria possível a realização do estudo.

À Diana e Renata, técnicas do laboratório de Microbiologia e de Instrumentação, pela paciência e ajuda nos momentos de dúvidas e a todos os técnicos e funcionários do DTA e DEPAN pelo apoio.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Embalagens: Eliene, Simone, Alê (meu psicólogo favorito), Edilma, Fabi e o agregado Erick Almeida, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Aos secretários da SPG/FEA, Cosme Perota e Marcos Sampaio Silveira, pela paciência e auxílios diversos.

Aos funcionários do DTA/FEA, José Roberto, Adauto, Léo, Adriana, Sandra, Leila e as secretárias Marlene e Tânia pela disposição e auxílios diversos.

A meu grande amigo do Ceará Wellington Oliveira (DCA/FEA), pelo carinho, amizade, companheirismo, conselhos e exemplo de que, por mais apertado que o prazo esteja no final tudo dá certo. Sem ele, a minha vida em Campinas e na Unicamp não seria a mesma.

Aos amigos da FEA, cujos auxílios diversos, incentivo, apoio e amizade foram essenciais: Bruna Porto, Talitinha, Ruann, Mária, Vanessa, Kazumi, Karina, Georgia, Tata, Ingrid (Lab. Frutos), Márcio (Lab. Cereais), Rita (Lab. Óleos), Alline Tribst.

Ao quarteto fantástico do DTA: Bruninho (parceiro), Lelê, Thiago e Miguel, pela amizade, carinho, caronas, muitas gargalhadas e muitos BKs.

Aos amigos que fiz em Campinas, os quais confirmam que a vida ainda é espaço para boas surpresas e muitas risadas: Bia, Pedro (IFCH), Marcos (IFCH) e Daniel (IEL).

Às minhas queridas amigas do “apê do sucesso” Ludmilla e Fernanda Ortolan, que tornaram a convivência mais agradável nessa caminhada. Muito obrigada pelo carinho, companheirismo e amizade que vou levar para sempre.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Morgano (CCQA/ITAL) pela colaboração com as análises de minerais.

À Profa. Dra. Juliana Pallone e Ana Paula (DCA/FEA) pela colaboração nas análises físico-químicas.

À Universidade Federal do Ceará e à UNICAMP, e a seus professores (em especial a Profa. Dra. Sueli Rodrigues) e funcionários, pela colaboração para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Christian Hansen pelas culturas probióticas e informações fornecidas.

A todos que incentivaram ou contribuíram de alguma forma, para o ingresso, durante a jornada ou para que fosse possível chegar ao fim.

Muito obrigada!

Obrigada Senhor!

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

Filipenses 4:13

Introdução

Introdução Geral

O interesse por alimentos saudáveis, nutritivos e com alegação de propriedades funcionais tem crescido mundialmente, o que resulta em diversos estudos também na área de produtos lácteos (RODRIGUES et al, 2012).

Além da conscientização dos consumidores, órgãos governamentais de diversos países alertam sobre os riscos da ingestão de alguns nutrientes, como maneira de reduzir o risco de doenças, e relacionam o consumo excessivo de sódio com problemas de saúde. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, as doenças do sistema circulatório, como a hipertensão arterial, constituem-se a primeira causa de morte no país, além de representarem um alto número de internações no Sistema Único de Saúde, significando grandes gastos para o Governo (BRASIL, 2008).

O queijo é considerado um gênero alimentício com elevados níveis de sódio, dessa forma, reduzir o conteúdo de sódio neste produto poderá contribuir para a redução do consumo geral de sódio pelos consumidores (AGARWAL et al., 2011). Nesse cenário, um dos maiores desafios da indústria de produtos lácteos tem sido a reformulação destes produtos a fim de reduzir o teor de gordura e sódio, em geral bastante elevados, uma vez que o sal exerce funções específicas no sabor, textura e na conservação dos queijos (AYYASH et al., 2011; AYYASH & SHAH, 2010; GUINEE & FOX, 2004; KATSIARI et al., 1997 e 2000).

Nesse mesmo contexto, uma tendência que se fortalece no mercado mundial de alimentos é o consumo de alimentos funcionais. É o caso, por exemplo, dos alimentos que contêm culturas probióticas. O mercado global de produtos probióticos em 2009 foi de aproximadamente US\$19 bilhões, chegou a cerca de US\$ 21,6 bilhões em 2010 e deve chegar a 31.100 milhões de dólares em 2015 a uma taxa de crescimento anual composta de 7,6% para um período de cinco anos (BBC RESEARCH, 2011).

Os queijos apresentam algumas vantagens tecnológicas como alimentos carreadores de bactérias probióticas para o organismo humano, por serem produtos sólidos, conferem proteção às bactérias probióticas contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares, durante a sua passagem pelo trato

gastrointestinal, contribuindo para que cheguem viáveis no intestino (CRUZ et al., 2009).

Tendo em vista os benefícios apresentados pelos queijos para a veiculação de probióticos e diante do fato do queijo Cottage ser um queijo com baixo teor de gordura, a produção de queijo Cottage adicionado de bactérias probióticas, pode gerar um produto de alto valor agregado, sendo considerado um alimento funcional.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo, apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os principais temas abordados: alimentos funcionais, probióticos, benefícios à saúde adquiridos pela ingestão de alimentos contendo culturas probióticas, o mercado de produtos probióticos, culturas probióticas, queijos probióticos, redução de sódio, sais hipossódicos e queijo Cottage. No segundo capítulo, determinou-se se a intensidade de gosto salgado ideal, o poder de salga de sais hipossódicos e a influência desses sais na aceitação sensorial do queijo Cottage probiótico. O terceiro capítulo apresenta os resultados da avaliação das características físico-químicas e da viabilidade das culturas *starter* e probióticas utilizadas no processamento do queijo Cottage probiótico durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

Referências Bibliográficas

AGARWAL, S.; McCOY, D.; Graves, P.D.; Clark, S. Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and process cheeses varies considerably in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1608-1611, 2011.

AYYASH, M.M. & SHAH, N.P. Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Halloumi Cheese during Storage: Chemical Composition, Lactic Bacterial Count, and Organic Acids Production. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 525-529, 2010.

AYYASH MM, SHERKAT F, FRANCIS P, WILLIAMS RPW, SHAH NP. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 37-42, 2011.

BBC RESEARCH, 2011. **Probiotics market to grow to \$31.1 billion globally in 2015**. 14 de outubro de 2011.

Disponível em: <http://bccresearch.blogspot.com.br/2011/10/probiotics-market-to-grow-to-311.html>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2014.

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. **Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não transmissíveis**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/volume_8_completo.pdf. Acesso em: 13 de fevereiro de 2014.

CRUZ, A. G., F. C. A. BURITI, C. B. H. SOUZA, J. A. F. FARIA, AND S. M. I. SAAD. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends Food Science Technology**, v. 20, p. 344–354, 2009.

GUINEE, T.P. & FOX, P.F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In Fox, P.F. (3rd ed.), London: Chapman & Hall. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, v.1, p. 207-259, 2004.

KATSIARI, M.C., ALICHANIDIS, E., VOUTSINAS, L.P., ROUSSIS, I.G. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. **International Dairy Journal**, v.10, p. 635-646, 2000.

KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. & ROUSSIS, I.G (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 465-472, 1997.

RODRIGUES D., T. ROCHA-SANTOS, A. FREITAS, A. GOMES, A. DUARTE.
Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods.
Trends in Analytical Chemistry, v.41, p.1-19, 2012.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica e Objetivos

1.1 Alimentos funcionais

Diante das evidências científicas que destacam os alimentos como agentes promotores da saúde, têm-se intensificado a pesquisa e o desenvolvimento de alimentos que apresentem propriedades funcionais. Um alimento pode ser considerado funcional quando, além do papel básico de nutrir, também contém em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser consumido em uma dieta usual, desencadeia processos metabólicos ou fisiológicos, resultando em redução do risco de doenças e manutenção da saúde (ANJO, 2004; MACHADO, 2007).

De acordo com Souza et al. (2003), os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram a capacidade de regular as funções corporais, de forma a auxiliar na prevenção e proteção contra doenças. Segundo Roberfroid (2002), um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem estar e saúde, bem como para reduzir os riscos de doenças. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998; KOMATSU et al., 2008).

Determinados componentes bioativos presentes nos alimentos caracterizam o termo funcional. Podem ser citados como exemplos os probióticos, as fibras, os fitoquímicos, as vitaminas, os minerais, os ácidos graxos ômega 3, além de determinados peptídeos e proteínas. Complementarmente, a fisiologia do intestino, assim como a composição e atividade do ecossistema microbiano responsável pela sua colonização, tem atraído grandioso interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais, o que é relevado pelos recentes desenvolvimentos visíveis no mercado de probióticos, prebióticos e simbióticos (ROBERFROID, 2005; KOMATSU et al., 2008).

1.2 Probióticos

O conceito de probiótico é bem antigo, no início da década de 1950, pesquisas já abordavam o uso de probióticos, no emprego da restauração da saúde de indivíduos desnutridos (KOLLATH, 1953). Vergin (1954) sugeriu que a administração de probióticos poderia restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal após um tratamento com antibióticos. O mesmo ponto de vista foi defendido por Kolb (1955), que reconheceu os efeitos prejudiciais de uma terapia com antibióticos e propôs uma prevenção com probióticos. Lilly e Stillwell (1965) definiram probióticos como “substâncias secretadas por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro”. A palavra “probióticos” foi inicialmente usada como antônimo da palavra “antibiótico”. É derivada da palavra pró e bioto e quer dizer “para a vida” (HAMILTON et al., 2003).

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, trazem benefícios para a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Paralelamente, um alimento probiótico é definido como um produto processado que contém micro-organismos probióticos viáveis em um meio adequado e em concentração suficiente (SAXELIN, 2008). Isso significa que a viabilidade e a atividade metabólica desses micro-organismos benéficos devem ser mantidas durante todas as fases e operações do processamento do alimento, desde a elaboração até a sua ingestão pelo consumidor, sendo também capaz de sobreviver no trato gastrointestinal (SANZ, 2007).

Na literatura científica, populações de 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ no produto final são estabelecidas como sendo quantidades terapêuticas mínimas de culturas probióticas em alimentos processados (TALWALKAR et al, 2004), atingindo 10^8 - 10^9 UFC providos por um consumo diário de 100g ou 100 mL do alimento, beneficiando, assim, o ser humano (JAYAMANNE e ADAMS, 2006). No Brasil, a presente legislação determina que a quantidade mínima viável da cultura probiótica deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC por dia, ou seja, por porção de produto e que a quantidade de micro-organismos presentes no produto deve constar no

seu rótulo. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (ANVISA, 2008).

As bactérias ácido-láticas (BAL) compreendem a classe mais representativa dos micro-organismos probióticos constituindo um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas, largamente utilizadas para a produção de alimentos fermentados, que têm em comum características metabólicas e morfofisiológicas. Comercialmente, as bactérias mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ressaltando-se que a seleção dessas bactérias possui como base os seguintes critérios: a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Entre os requisitos, inclui-se, ainda, a segurança para uso humano, ter histórico de não patogenicidade e não estar associada a outras doenças, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Os micro-organismos permitidos para a produção de alimentos probióticos no Brasil pela ANVISA (BRASIL, 2008a) são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

1.2.1 Benefícios à saúde

Inúmeros benefícios à saúde são adquiridos pela ingestão de alimentos contendo culturas probióticas, sendo alguns já provados cientificamente e outros necessitando, ainda, de estudos mais aprofundados (GRANATO et al., 2010a).

Os principais efeitos benéficos à saúde relacionados aos probióticos são: atividade antimicrobiana, prevenção e tratamento de diarreias, alívio dos sintomas de intolerância a lactose, a redução dos níveis de colesterol, atividades

antimutagênicas e anticarcinogênicas, estímulo do sistema imunológico, melhora da saúde urogenital, alívio da constipação, otimização de efeito de vacinas, tratamento de resfriados e infecções de inverno (PATEL et al., 2009; NAGPAL et al, 2007; SHAH, 2007; SANDERS, 2008).

A melhora da intolerância à lactose, através do uso de probióticos é atribuída ao fato deles produzirem a enzima β -D-galactosidase, auxiliando a hidrólise da lactose no intestino, no entanto, o mecanismo de como o processo ocorre ainda não é bem entendido. Acredita-se que a modificação de pH intestinal, devido à presença de β -galactosidase, pode trazer efeitos positivos sobre as funções intestinais e sobre a microbiota intestinal (ROBERFROID, 2000; KOPPHOOLIHAN, 2001; HE et al, 2008).

Fooks, Fuller e Gibson (1999) acrescentam que os probióticos podem assimilar diretamente o colesterol ou interferir na sua absorção intestinal, o que levaria à redução das suas taxas.

Quanto à atividade antimicrobiana atribuída aos probióticos, os micro-organismos probióticos inibem o desenvolvimento de bactérias patogênicas por mecanismos de exclusão competitiva que incluem: a) metabolismo acelerado de nutrientes específicos (açúcares, vitaminas e aminoácidos são metabolizados e tornam-se indisponíveis aos patógenos); b) competição por sítios de ligação (promovem o bloqueio dos sítios e/ou receptores na mucosa entérica, reduzindo a área de interação das bactérias patogênicas); c) produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e ácido láctico) e d) competição por nutrientes (AMORES et al., 2004; DRISKO; GILES; BISCHOFF, 2003; ESCALANTE, 2001; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; MITSUOKA, 1978; PENNA et al., 2000).

Com relação às atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas atribuída aos probióticos, estudos relataram estimulação da função imunológica (CROSS et al., 2002; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2008) e supressão de câncer através do consumo desses micro-organismos (MA et al., 2010). Pesquisas têm demonstrado que os probióticos podem diminuir as concentrações fecais e atividades de certas enzimas, como β -glucuronidase, azorreductase e

nitrorredutase, que estão envolvidos na ativação de agentes mutagênicos (COMMANE et al., 2005; ORRHAGE et al., 1994) e diminuição de sais biliares secundários, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer de cólon (GONET-SURAWKA; STRUS; HECZKO, 2007; WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001).

Bactérias probióticas têm sido recomendadas para o tratamento de dermatites atópicas, enterocolites, colites pseudomembranosas, doenças hepáticas crônicas, doenças alérgicas e alergias alimentares (CANDY et al, 2008; REIFF e KELLY, 2010). Maslowski et al. (2009) comprovou, em sua pesquisa, que os ácidos graxos de cadeia curta, produtos do metabolismo das bactérias probióticas, atuam em uma molécula do organismo, denominada receptor GPR43, facilitando o controle de inflamações.

É importante mencionar que os efeitos de promoção de saúde dependem da linhagem/cepa presente na formulação do produto e que não existe uma cepa probiótica capaz de conferir todos os benefícios recentemente reportados (SHAH, 2007).

1.3 Mercado de produtos probióticos

O mercado global de produtos probióticos foi estimado em 24,23 bilhões dólares americanos em 2011. Mais de 500 produtos probióticos foram introduzidos na década passada. Estes produtos têm recebido diferentes níveis de sucesso, principalmente em congruência com seus benefícios para a saúde global (MARKETS AND MARKETS, 2013).

O iogurte é a matriz alimentícia mais utilizada para a suplementação de bactérias probióticas. Contudo, outros produtos lácteos e não lácteos também tem passado por essa adição, como as bebidas fermentadas, sorvetes, sobremesas e, em especial, os queijos que tem recentemente despertado o interesse das indústrias além de crescente aceitação dos consumidores (GRANATO et al., 2010a).

O mercado global de alimentos funcionais ainda é dominado por produtos lácteos, com vendas no valor US\$ 9.23 bilhões em 2010, o equivalente a mais de 38% da indústria geral. Apesar de continuar a deter uma posição forte na Europa,

os produtos lácteos funcionais também estão fazendo forte progresso nos EUA, devido ao sucesso de bebidas como iogurte probiótico (LEATHERHEAD FOOD RESEARCH, 2011).

No Brasil as vendas de alimentos funcionais atingiram US\$ 500 mil o que corresponde a 1% dos alimentos vendidos em 2007. Além disso, 65 % dos alimentos funcionais comercializados no país são produtos probióticos. Outro fator de destaque é que de todos os probióticos apenas o gênero *Lactobacillus* representou 61,9% das vendas no mundo em 2007 (GRANATO et al., 2010a; GRANATO et al., 2010b).

Segundo um relatório publicado em *Transparency Market Research 2013*, a demanda mundial de probióticos foi avaliada em US\$ 27.9 bilhões em 2011 e deve chegar a US\$ 44,9 bilhões em 2018, crescendo a uma taxa anual média de 6,8% (2013-2018). Ásia-Pacífico e Europa dominam o mercado global em termos de demanda, e também é esperado que a Ásia-Pacífico seja o mercado mais promissor no futuro próximo. Os mercados da América do Norte e os países como o Brasil também mostram enorme potencial de crescimento da demanda.

1.4 Culturas probióticas

Para o micro-organismo ser denominado probiótico deve apresentar: (a) tolerância à acidez, ao suco gástrico e bile, sendo capazes de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal; (b) aderir à mucosa intestinal humana; (c) produzir substâncias antimicrobianas, com concomitante inibição de patógenos, ou seja, efeito imunomodulador; (d) propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (GOMES & MALCATA, 1999; SAARELA et al., 2000; DEL PIANO et al, 2006).

Algumas espécies de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais comumente empregadas como probióticos em produtos lácteos por sua comprovada atividade funcional. Estes gêneros de micro-organismos são comuns no trato gastrointestinal de humanos saudáveis, encontrados principalmente e respectivamente, no íleo terminal e cólon (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA, BIEDRZYCKA & MAJKOWSKA, 2002).

As bactérias probióticas utilizadas na produção em escala industrial e de processamento devem ser apropriadas para cada tipo de produto e manter-se com boa viabilidade durante o armazenamento. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos. Conseqüentemente, em alimentos fermentados, o pH tende a ser bastante reduzido e o desempenho desses micro-organismos é baixo. Por esse motivo, os produtos com menor vida de prateleira, como o iogurte e leites fermentados, são os mais comumente utilizados como veículos de probióticos, apesar de já existirem produtos probióticos com maior vida de prateleira, como o queijo tipo *Cheddar* (STANTON et al., 2005).

Uma excelente alternativa para aumentar a multiplicação de um probiótico é a adição de outra espécie probiótica em co-cultura. Alguns estudos relatam que pode haver uma relação de comensalismo entre culturas mistas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, resultando numa fase lag mais curta deste último, quando comparada com a fase lag em culturas de estirpe única (KONGO et al., 2006). Entretanto, deve-se verificar a compatibilidade entre as culturas a serem empregadas, pois alguns metabólitos produzidos por uma cultura pode ser prejudicial ao crescimento de outra.

Gomes e Malcata (1998) demonstraram que *Bifidobacterium lactis* multiplicaram-se mais em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*. O estímulo da multiplicação de *Bifidobacterium bifidum* por *Lactobacillus acidophilus* também foi descrito (SVENSSON, 1999).

KONGO et al (2006) desenvolveram leite fermentado de cabra, utilizando uma cultura mista de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* que apresentou excelente desempenho ao longo da estocagem do produto.

1.4.1 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* contém grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, são caracterizados geralmente como gram-positivos, não formadores de esporos e podem ser aerotolerantes ou

anaeróbios restritos. São capazes de crescer em temperaturas que variam de 2 a 53 °C, com valores ótimos, geralmente, de 30 a 40 °C, e pH ótimo entre 5,5 e 6,2. Fermentam glicose para ácido láctico em cepas homofermentativas e as cepas heterofermentativas produzem ácido láctico, etanol e CO₂ (e/ou ácido acético). Aproximadamente 56 espécies do gênero *Lactobacillus* são conhecidas, entre estes o *Lactobacillus acidophilus* é o mais utilizado e estudado (O'SULLIVAN, 2006).

O *Lactobacillus acidophilus* é microaerófilo, possui a capacidade de fermentar celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose, trealose e esculina. O leite possui em sua maioria lactose, porém a espécie *Lactobacillus acidophilus* tem maior predominância em metabolizar sacarose. Além disso, a galactose produto da hidrólise de lactose não possui um grau de metabolização favorável, diferentemente da glicose e frutose oriundas da hidrólise da sacarose, sendo que a fermentação da glicose possui como único aceptor final o ácido láctico (GOMES e MALCATA, 1999), composto desejável na produção de leite fermentado (FARNWORTH, 2008). Além disso, esta espécie tem alta capacidade tamponante citoplasmática, o que permite maior resistência às mudanças no pH do citoplasma conferindo à bactéria maior estabilidade em condições ácidas (RIUS et al., 1994).

Algumas linhagens de *Lactobacillus acidophilus* são comprovadamente probióticas podendo melhorar a funcionalidade dos produtos aos quais forem adicionados, por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K. Além de modular a microbiota intestinal, reforçar o sistema imune, auxiliar no tratamento contra infecções intestinais (SAZAWAL et al., 2006; SAARELA et al., 2000) e diminuir o risco de carcinogenicidade por serem capazes de reduzir os níveis de enzimas responsáveis por ativar os pró-carcinógenos (RAFTER, 2002).

Os benefícios nutricionais dos probióticos têm sido estudados em sua maioria nos produtos à base de leite fermentado contendo *Lactobacillus* e/ou bifidobactéria. Entretanto, a produção de leite fermentado de alta qualidade contendo probióticos é um grande desafio para fábricas de laticínios devido ao

caráter sensível dos micro-organismos nesses bioprodutos. Porém quando comparado a outras espécies probióticas a capacidade do *Lactobacillus acidophilus* em tolerar baixas concentrações de oxigênio e resistir ao pH de leite fermentado (pH 4,6) contribuem para sua utilização na produção de leite fermentado (GOMES e MALCATA, 1999).

1.4.2 O gênero *Bifidobacterium*

As bifidobactérias são caracterizadas por serem micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, anaeróbios estritos com morfologia celular variável (GOMES; MALCATA, 1999), no entanto, algumas espécies, como *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium psychraerophilum*, podem tolerar concentrações de oxigênio moderadamente altas, e têm metabolismo fermentativo. Atualmente, mais de 30 espécies estão incluídas no gênero *Bifidobacterium* (MARGOLLES, 2011).

As bifidobactérias são organismos heterofermentativos com produção de ácido acético e lático na proporção de 3:2, sem geração de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato, e capazes de utilizar glicose, galactose, lactose e frutose como fontes de carbono (GOMES; MALCATA,1999). A temperatura ótima para crescimento oscila entre 37 e 41° C (GOMES; MALCATA,1999) e segundo Rasic e Kurmann (1983) e Danone (1997), os valores ótimos de pH para o crescimento de bifidobactérias estão entre 6,0-7,0, com ausência de crescimento em valores de pH ácidos de 4,5-5,0.

As concentrações de oxigênio e o pH exercem as maiores influências na sobrevivência das bifidobactérias durante a estocagem dos alimentos probióticos. A viabilidade das bifidobactérias em meios ácidos é muito variável, mas, em geral, pode-se considerar que a resistência dessas bactérias ao pH ácido é fraca, com a exceção da *Bifidobacterium animalis* (MASCO, 2005). Esta espécie tolera de forma satisfatória os valores de pH ácido e também às concentrações moderadas de oxigênio, e, por estas razões, são as mais usadas em produtos fermentados probióticos. Isto sugere 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).

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 organoléptica 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 que são 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).

As bifidobactérias possuem baixa capacidade de acidificação durante o processo de pós-acidificação na estocagem (GOMES; MALCATA, 1999). Os relatos desses autores estão de acordo com os dados observados nesta pesquisa com a linhagem de bifidobactérias *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen).

1.5 Queijos probióticos

A produção de queijos no Brasil está em uma curva crescente. Em 2011 foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país, 9,4% mais que em 2010, segundo os últimos dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ). Os queijos mais produzidos são: muçarela, requeijão culinário, prato, requeijão cremoso e *petit suisse*, nesta ordem. Também segundo dados da ABIQ, o Brasil já é o sexto maior produtor de queijos do mundo, porém possui um consumo per capita ainda muito baixo, de pouco mais de 4 kg por habitante por

ano, enquanto a França apresenta um consumo de 27 kg e a Itália 24 kg (BRASIL ECONÔMICO, 2013). O queijo Cottage é muito popular nos Estados Unidos, mas recentemente sua oferta e consumo vêm aumentando no Brasil.

O consumo de três porções diárias de leite, queijos e derivados lácteos, aliado a uma alimentação equilibrada, é importante não somente para fornecer os nutrientes de que o corpo precisa, mas também gerar diversos benefícios para a saúde. No entanto, deve-se, dar preferência também para os produtos lácteos com baixo teor de gordura ou desnatados (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2007).

A alta atividade de água, o pH do queijo, a sua matriz sólida, com uma concentração relativamente elevada de lipídios presentes são características que podem auxiliar na manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos, bem como oferecer proteção às bactérias probióticas durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal humano (CRUZ et al., 2009). 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., 2005). Baseados nessa observação, diversos autores sugeriram que o queijo é o produto mais adequado como veículo de probióticos, quando comparados aos leites fermentados e iogurtes (GARDINER et al., 1998; STANTON et al., 1998; DAIGLE et al., 1999; CORBO et al., 2001; HELLER et al., 2003; BOYLSTON et al., 2004; BERGAMINI et al., 2005).

Alguns autores consideram que a sobrevivência de bactérias probióticas em queijos frescos seja maior que nos queijos maturados, devido ao menor tempo de armazenamento, menor teor de sal e maior teor de umidade (BURITI et al., 2005).

1.6 Redução de sódio

O cloreto de sódio (NaCl), comumente chamado de sal de cozinha, é composto por 40% de sódio, sendo a principal fonte deste mineral na dieta humana, e assim como o potássio, tem a função de regular os fluidos celulares (BRASIL, 2005).

O sódio nos alimentos industrializados pode ser adicionado por duas fontes: o cloreto de sódio ou sal de cozinha e os aditivos alimentares. O sal para consumo humano é definido pela legislação brasileira na resolução RDC nº 28/2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como “cloreto de sódio cristalizado extraído de fontes naturais, adicionado obrigatoriamente de iodo” (BRASIL, 2000). O produto deve apresentar-se sob a forma de cristais brancos, com granulação uniforme, ser inodoro e ter sabor salino-salgado próprio. Além disso, não pode apresentar sujidades, micro-organismos patogênicos ou outras impurezas. Podem ser adicionados ao sal aditivos, como minerais (antiumectantes), desde que nos limites estabelecidos pela legislação. A designação “sal de mesa” vale para o sal refinado e o sal refinado extra nos quais foram adicionados antiiumectantes (BRASIL, 2000).

O consumo de sódio está associado com a elevação da pressão arterial, que é considerada um problema de saúde pública, sendo um fator de risco para doenças cardiovasculares, enquanto o consumo de potássio diminui o risco dessas doenças. O aumento da ingestão de sódio também ocasiona aumento da perda de cálcio na urina podendo contribuir para aumento da osteoporose (REDDY et al., 2004).

Segundo um grupo de pesquisa da Universidade de Alberta, no Canadá, uma dieta rica em sal está fortemente associada a casos de pedras nos rins e osteoporose. Quando a ingestão do sódio se eleva muito, o corpo cuida de descartar o excesso por meio da urina, só que como cálcio e sódio são regulados pela mesma molécula, juntamente com o excesso de sódio o cálcio (que não está em excesso) também é excretado (DIÁRIO DA SAÚDE, 2012).

Estudos demonstram que o consumo de sal aumenta progressivamente durante a infância e adolescência e se mantém constante na fase adulta (CRUZ et al., 2011a). Em uma pesquisa realizada com estudantes de 13 a 15 anos foi verificado que 23,2% deles se apresentam com sobrepeso ou obesidade (IBGE, 2009), o que é preocupante, considerando que o excesso de peso, assim como o consumo de álcool são fatores que também estão associados à hipertensão arterial (CRUZ et al., 2011a). Assim, o consumo de sódio deve ser limitado,

considerando todas as fontes na dieta, como por exemplos aditivos e conservantes, a fim de reduzir os riscos de saúde causados pelo consumo excessivo desse mineral. Diante de tais comprovações, a Organização Mundial da Saúde recomenda que o consumo de cloreto de sódio não deve ser superior a 2000 mg por dia, o que corresponde a 5 g de consumo de sal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Entretanto, no Brasil é estimado que o consumo pela população exceda em mais de duas vezes esse valor, sendo necessárias campanhas que informem a população sobre a importância de reduzir a quantidade de sal adicionado nos alimentos, assim como a redução da quantidade de sal adicionado em alimentos processados (SARNO et al., 2009). De fato, estima-se que 25% da população adulta brasileira, 50% após os 60 anos e 5% das crianças e adolescentes são acometidos pela hipertensão. A pressão arterial alta é responsável por 40% dos infartos, 80% dos derrames e 25% dos casos de insuficiência renal terminal. (BRASIL, 2010).

O consumo de sódio varia conforme as regiões do Brasil, o revela o peso dos hábitos alimentares regionais nos índices de ingestão desse nutriente. Segundo dados da Abia (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação) com base em dados do IBGE de 2008 e 2009, a região Norte registrou o maior volume de consumo de sódio do País. No período estudado, cada nortista consumia 5,41 g de sódio por dia, o correspondente a 13,8 g de sal. O alto índice de ingestão desse nutriente na região se deve principalmente à adição de sal de cozinha no preparo dos alimentos, que atingiu o volume de consumo diário de 10,87 g por habitante. A segunda região com maior consumo de sódio diário no Brasil foi o Centro-Oeste (5,26 g), seguido pelo Sul (5,06 g), pelo Nordeste (4,47 g) e, finalmente, pelo Sudeste (3,8 g) (ABIA, 2013).

Dessa forma, a Portaria 3092/2007 do Ministério da Saúde (MS) propõe a redução gradativa dos teores de sódio em alimentos processados (BRASIL, 2007). Em termo de compromisso elaborado junto às principais associações da indústria alimentícia, o MS compromete-se, em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a elaborar o Plano Nacional de Redução do

Consumo de Sal, a monitorar o teor de sódio nos alimentos processados, a acompanhar as tendências de consumo alimentar da população e avaliar o impacto da redução desse consumo nos custos do Sistema Único de Saúde (SUS) e na incidência de doenças crônicas (BRASIL, 2011). Recentemente, foi determinado que produtos alimentícios processados podem ser rotulados como “baixo”, “muito baixo” e “não contém” sódio, se apresentarem, respectivamente, no máximo 80 mg, 40 mg e 5 mg de sódio por 100 g ou 100 ml em pratos preparados, ou por porção do alimento. O atributo “reduzido” pode ser atribuído ao alimento com redução mínima de 25% no conteúdo de sódio em relação ao produto sem redução (BRASIL, 2012).

Em outros países como Canadá, o programa de “Estratégia de Redução de Sódio”, pretende ter 50% da população consumindo menos de 2.300 mg de sódio por dia até 2016, e inclui recomendações dirigidas ao fornecimento de alimentos, pesquisa, educação e conscientização. Diversos países lançaram iniciativas para reduzir a ingestão de sódio de suas populações, principalmente a Finlândia, Reino Unido, União Europeia e, mais recentemente, os Estados Unidos (HEALTH CANADA, 2010).

Um estudo americano publicado em 2010, mostra que mesmo uma redução modesta de 1 g de sal (400 mg de sódio) por dia alcançado ao longo de um período de 10 anos resultaria no decréscimo anual de número de casos de doença cardíaca coronária de 40.000 para 20.000, acidente vascular cerebral de 23.000 para 11.000, infarto do miocárdio de 35.000 para 18.000, e as mortes por todas as causas de 32.000 para 15.000 (HEALTH CANADA, 2010).

Segundo a conclusão de estudo da Abia (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação) com base em dados do IBGE de 2008 e 2009, os resultados que têm aval do Ministério da Saúde, é o sal de cozinha, e não a comida industrializada, a principal fonte de sódio dos brasileiros. Ele responde por 71,5% do total do nutriente ingerido no país. Os produtos da indústria respondem por 23,8% do total da ingestão de sódio. Cada brasileiro consome, em média, 4,46 gramas de sódio por dia, o equivalente a 11,38 gramas de sal. O limite recomendado pela Organização Mundial da Saúde é menos da metade: 5 g de sal

(equivalente a 2 g de sódio). Porém, as constatações do estudo não alteram o acordo com o Ministério da Saúde de reduzir 20.491 toneladas de sódio dos alimentos processados até 2020 (FOLHA DE SÃO PAULO, 2013).

Com relação ao iodo, a ANVISA também aprovou recentemente uma resolução que reduz os limites de iodo adicionado no sal para consumo humano, segundo a RDC nº 23, de 24 de abril de 2013. De acordo com a agência reguladora, há indícios de que o consumo excessivo da substância possa aumentar os casos de tireoidite de Hashimoto, doença autoimune que tem entre seus principais sintomas fadiga crônica, cansaço fácil e ganho de peso. A norma atualmente vigente fixa uma faixa entre 20 mg e 60 mg de iodo para cada quilo de sal. Com a nova resolução, a faixa de adição de iodo no sal permitida fica entre 15 mg e 45 mg. Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) determina que os limites de adição de iodo no sal devem ficar entre 20 mg e 40 mg para países em que a população consume uma média de 10 g de sal por dia (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

1.6.1 Sais hipossódicos

A utilização de substitutos do cloreto de sódio (NaCl) como opção terapêutica para reduzir o consumo de sódio, é relevante. Uma opção atualmente utilizada como substituto do NaCl, são os sais hipossódicos.

No Brasil, a ANVISA estabelece na portaria nº 54, de 04 de julho de 1995, que sais hipossódicos devem apresentar teor reduzido de sódio (Na⁺) (50% daquele presente em uma mesma quantidade de NaCl) além de KCl, como ingredientes obrigatórios. Porém, outros compostos podem ser adicionados de modo que a mistura final mantenha poder de salga semelhante ao do NaCl, e/ou tentar reduzir os sabores indesejáveis causados pela adição do KCl (BRASIL, 1995). Dentre esses compostos, citam-se: sais de potássio (sulfato de potássio, acetato de potássio), de cálcio (cloreto de cálcio), de magnésio (cloreto de magnésio e sulfato de magnésio) e de amônio (cloreto de amônio), sais dos ácidos adípico, glutâmico (como o glutamato monossódico), carbônico (carbonato de sódio), succínio (succinato de potássio), láctico (lactato de potássio), tartárico

(tartarato de sódio), cítrico (citrato de cálcio), acético (acetato de sódio), hidrocloreídrico, ortofosfórico, dentre outros.

O sal hipossódico possui duas classificações: “sal com reduzido teor de sódio”, que fornece 50%, no máximo, do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio, e “sal para dieta com restrição de sódio”, que fornece 20%, no máximo, do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio. O sal hipossódico, nas duas classificações, deve possuir, obrigatoriamente, cloreto de sódio, cloreto de potássio e iodo, todos adequados à legislação nacional vigente. Outros ingredientes podem ser adicionados opcionalmente de acordo com a legislação (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

O KCl possui características similares ao NaCl e apresenta uma eficiência antimicrobiana equivalente (BIDLAS e LAMBERD, 2008). Além disso, a ingestão de potássio não tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão e doenças cardiovasculares (BUEMI et al, 2002; GELEIJNSE et al, 2007; KIMURA et al, 2004). No entanto, defeitos sensoriais relacionados a diminuição do gosto salgado e surgimento de gosto amargo, metálico e adstringente são comumente noticiados a partir do nível de 40% de substituição de NaCl por KCl e se configuram na principal limitação da utilização de KCl em salames (GOU et al., 1996; GELABERT et al., 2003).

Com relação à comercialização, o cloreto de potássio é comercializado por várias empresas e em diferentes combinações, sendo que as mais conhecidas contêm 780 mg/g de KCl (derivado do ácido clorídrico) e 200 mg/g de NaCl; e 19,6 g Na/100 g e 26 g de K/100 g. Na Argentina é comercializado um sal dietético com 5mg/g de sódio, também em versões contendo especiarias e composto por cloreto de potássio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. Outro sal hipossódico disponíveis no mercado internacional é o *Morton® Lite Salt™ Mixture*, composto por cloreto de sódio, cloreto de potássio e iodo. No Japão se comercializa o *LS-50 Salt Alternative*, composto por cloreto de potássio, soro de leite com redução de lactose, e hidrolisado protéico vegetal (possui 85% da salinidade do cloreto de sódio). É muito utilizado para reduzir o conteúdo de sal no molho de soja (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

No Brasil é comercializado o sal Cisne *Light* e o Cisne *Light Mais* (fonte de 6 minerais), um sal hipossódico com 50% menos sódio que o sal Cisne Tradicional. Ele é composto por sal hipossódico, cálcio (carbonato de cálcio), magnésio (óxido de magnésio), iodato de potássio, zinco (óxido de zinco), antiemectantes (ferrocianeto de sódio e dióxido de silício) e selênio (selenito de sódio).

1.7 Queijo e redução de sódio

Dentre os produtos lácteos, o queijo apresenta contribuição decisiva no consumo de sódio (MHURCHU, 2011), sendo observado que os níveis de sódio determinados de forma analítica não são condizentes com o exposto no rótulo do produto; tendo sido encontrada variação de 125% e 106% para queijo Minas frescal nas versões integral e “light”, respectivamente (SILVA e FERREIRA, 2010). Resultados similares foram observados para queijos *cheddar*, mussarela e queijo processado, queijos esses populares nos Estados Unidos, sendo verificado que os fabricantes desses tipos de queijos necessitarão reformular seus processos a fim de atender as recomendações mundiais das Agências de Saúde (AGARWAL et al., 2011).

A substituição do cloreto de sódio por outros sais, ou a sua simples redução implica em diversas barreiras no processamento de queijos, com reflexos na qualidade físico-química, reológica, funcional e sensorial do produto (CRUZ et al., 2011a). O sal modifica as interações entre as proteínas, a atividade de água do queijo, as características físicas e de funcionalidade do queijo, além de interferir na atividade microbiana (PASTORINO et al., 2003).

A ingestão de potássio, cálcio e magnésio atenuam o efeito hipertensivo ocasionado pelo excesso de sal (KARPPANEN, 2006), nesse contexto, uma opção tecnológica bastante difundida é substituir o NaCl por cloreto de potássio (KCl) para reduzir o teor de sódio dos alimentos. O KCl ajuda a manter o gosto salgado e pode reduzir o teor de sal nos alimentos em até 25%, sem perdas na palatabilidade (FLATCHEL, 2008). Entretanto, este sal confere um gosto residual amargo ao alimento, que os consumidores consideram desagradável, porém,

melhores resultados são obtidos quando misturamos diferentes sais minerais (BRANDSMA, 2006; VANDENDRIESSCHE, 2008). Trabalhos envolvendo queijos com reduzido teor de sódio apresentam-se em ascensão (KAMLEH et al., 2012; AYYASH e SHAH, 2011 a,b; GOMES et al., 2011a; ČERNÍKOVÁ et al., 2010; VAN DENDER et al., 2010) sendo relacionados aos queijos de alto consumo nos respectivos países.

Em queijo Minas frescal, a substituição parcial de NaCl por KCl (cloreto de potássio) resultou em queijos que apresentaram maiores valores de dureza e maiores teores de cálcio, em relação ao queijo controle (sem substituição), e a formulação produzida com 25% de KCl apresentou pontuação semelhante à formulação controle na análise sensorial, sugerindo que é possível a produção de queijo Minas frescal com baixo teor de sódio e boa aceitação sensorial. (GOMES et al., 2011a). O potássio e o sódio possuem efeitos contrários sobre a pressão arterial e ambos são importantes para a manutenção do equilíbrio. Muitos estudos têm indicado que o aumento da ingestão de potássio via dieta pode exercer efeito protetor em indivíduos com indução a hipertensão pelo sódio, redução da excreção de cálcio na urina e efeito protetor aos ossos (ALINO, 2009).

O magnésio é o cátion intracelular mais importante, depois do potássio. O magnésio é um cofator em mais de 300 sistemas de enzimas que regulam diversas reações bioquímicas no corpo, incluindo a síntese de proteínas, função muscular e nervosa, controle de glicose no sangue, e regulação da pressão arterial. O magnésio também desempenha um papel no transporte ativo de íons de cálcio e potássio através das membranas celulares, um processo que é importante para a condução do impulso nervoso, contração muscular e ritmo cardíaco normal (RUDE RK, 2012).

Apesar dos aspectos negativos relacionados ao consumo excessivo do cloreto de sódio, este sal tem fundamental importância na conservação de alimentos, pois se mostra eficiente na proteção contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o que deve ser levado em consideração quando se deseja substituí-lo, a fim de garantir a segurança microbiológica do produto (TAORMINA, 2010).

1.8 Queijo Cottage

O nome “Cottage” relaciona-se com suas origens, ou seja, é um queijo típico das vilas e aldeias. A origem específica do queijo Cottage é desconhecida, apesar de muitos autores afirmarem que este queijo surgiu na Grã-Bretanha, sendo difundido em todos os países de origem anglo-saxônica, a produção industrial começou nos Estados Unidos por volta de 1916 (RODRIGUES, 1999; FARKYE, 2004).

O queijo Cottage é um tipo de queijo fresco, levemente ácido, produzido pela coagulação do leite desnatado pasteurizado (BRASIL, 1996). Possui como característica a textura granular da massa coalhada com partículas de tamanho relativamente uniforme que pode ser misturada opcionalmente a um líquido cremoso, denominado *dressing* (RODRIGUES, 1999).

Nos Estados Unidos o queijo Cottage é definido como um “queijo de pasta mole, não curado, preparado pela mistura da coalhada seca do queijo com uma mistura cremosa”. A coalhada desse queijo pode ser fabricada pela coagulação ácida do leite desnatado, normalmente por meio da atividade da cultura *starter*, embora o leite também possa ser acidificado diretamente (DRAKE et al., 2009).

Os queijos tipo Cottage, *Quark*, *Cream cheese*, *Fromage* e Ricota são comercialmente os mais importantes tipos de queijo fresco de coagulação ácida cujo consumo tem aumentado, porque eles são percebidos como saudáveis pelos consumidores preocupados com a dieta. Em geral, o teor de gordura destes queijos é bem menor do que a dos queijos fabricados por coagulação enzimática (FOX et al. 2000).

Atualmente, existem diversas variedades de queijo Cottage com diferentes consistências, diferentes níveis de gordura e conteúdo de umidade. A composição média para o queijo Cottage é cerca de 80% de umidade, teor de gordura na faixa de 4%, e 25% de gordura na matéria seca e, portanto, são classificados como queijo com baixo teor de gordura (ARAÚJO 2007). De acordo com a lei dos EUA, a gordura máxima é de 0,5% para grãos de coalhada seca e em torno de 4% para o queijo Cottage com *dressing* (FARKYE 2004).

É um queijo que apresenta um elevado rendimento devido ao seu alto teor de umidade (80%). Em média para se fabricar 1kg de queijo utiliza-se aproximadamente 4,5L de leite. O rendimento é influenciado pela concentração e estado da caseína em sólidos no leite. A fragilidade da coalhada antes do corte e a agitação excessiva durante o processamento reduzem o rendimento e resultam em um queijo de qualidade inferior (ARAÚJO et al., 2012).

A legislação brasileira, até o momento não possui padrões de identidade e qualidade específicos para queijo Cottage, o que dificulta comparações, com base na legislação, entre diferentes marcas comerciais (PARODIA, 2010).

Com relação ao queijo Cottage, ele pode ser fabricado através de três diferentes métodos. O método baseado no tempo de coagulação (curta, intermediária ou longa), método onde há a utilização de micro-organismos do fermento láctico (cultura *starter*) e o método por acidificação direta. O processo de fabricação, após a coagulação do leite, compreende as etapas de: tratamento térmico, resfriamento/lavagem da massa, drenagem, adição do *dressing* e embalagem (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

No que diz respeito ao seu potencial funcional, o queijo Cottage tem sido mostrado como uma matriz alimentícia capaz de ser suplementada com bactérias probióticas (ARAÚJO et al., 2009). Não são relatados, até o presente momento, trabalhos envolvendo simultaneamente o desenvolvimento de queijo Cottage com redução de sódio e suplementado de bactérias probióticas, bem como uso simultâneo de outros sais substitutos do cloreto de sódio, como o cloreto de magnésio. Consequentemente, isso demonstrará a relevância deste estudo, no sentido de aumentar o caráter funcional e a possibilidade de proporcionar uma maior redução no nível de cloreto de sódio em produtos lácteos.

Para o queijo cottage, por exemplo, a adição de probióticos junto com o *dressing* e o sal é uma alternativa aceitável, já que a concentração do probiótico adicionado pode ser precisamente controlada e os efeitos adversos de uma escaldada em temperatura elevada não existem para esse tipo de queijo (HELLER et al., 2003).

1.9 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi estabelecer parâmetros de tecnologia para desenvolver um queijo Cottage probiótico com reduzido teor de sódio e acompanhar as mudanças ocorridas ao longo da vida de prateleira deste produto, relacionando-as com as alterações em sua composição pela adição de diferentes sais substitutos do cloreto de sódio.

Para uma avaliação global deste objetivo, o mesmo foi subdividido em objetivos específicos:

1. Determinar a intensidade de gosto salgado ideal bem como o poder de salga de sais hipossódicos em queijo Cottage probiótico (Capítulo 2);
2. Avaliar a influência dos sais hipossódicos na aceitação sensorial do queijo Cottage probiótico (Capítulo 2);
3. Verificar a viabilidade da cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, e das culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante o período de armazenamento refrigerado (Capítulo 3).
4. Verificar o efeito da substituição parcial de NaCl por KCl e MgCl₂ nos parâmetros de qualidade do queijo Cottage probiótico durante 28 dias de estocagem refrigerada (Capítulo 3).

1.10 Referências Bibliográficas

ABIA, 2013. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. **Cenário do consumo de sódio no Brasil**. Junho de 2013. Disponível em: <http://www.abia.org.br/sodio/Sodio2.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2014.

AGARWAL, S.; McCOY, D.; GRAVES, P.D.; CLARK, S. Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and process cheeses varies considerably in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1608-1611, 2011.

ALINO, M. et al. Influence of sodium replacement on physicochemical properties of dry-cured loin. **Meat Science**, Barking, v. 83, n. 3, p. 423–430, Nov. 2009.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D. Probióticos. **Revista Española de Quimioterapia**, v.17, p.131-139, 2004.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, p.145-154, 2004.

ANVISA, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 01 de dezembro de 2013.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento de queijo tipo cottage simbiótico e análise de sobrevivência do Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 em condições de simulação do trato gastro digestório**. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 2007.

ARAUJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S.; FURTADO, M.M.,MORAES, C.A. Produção de queijo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas em diferentes níveis de estresse. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, p. 111-118, 2009.

ARAÚJO, E. A.; PIRES, A. C. S.; PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.. Cottage Cheese: Fundamentals and Technology. In: Y. H. Hui; E. Özgül Evranuz. (Org.).

Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology. 2ed. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, v. 1, p. 257-268, 2012

AYYASH, M.M.; SHAH, N.P. Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 3769-3777, 2011a.

AYYASH, M.M.; SHAH, N.P. The effect of substitution of NaCl with KCl on chemical composition and functional properties of low-moisture Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 2701-2706, 2011b.

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

AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th Ed., **American Oil Chemists' Society**, Champaign, IL, 2004.

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

BIDLAS, E., & LAMBERT, R. J. W. Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p. 98–102, 2008.

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

BRANDSMA, I. Reducing Sodium. A European perspective attitudes and regulations regarding sodium in foods pose challenges for the food industry. **Food Technology**, v.60, p.24-29, 2006.

BRASIL ECONÔMICO, 2013. **Uma fatia especial do mercado de queijos.** Disponível em: <http://brasileconomico.ig.com.br/noticias/nprint/133049.html>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2014.

BRASIL, 1995. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Portaria Nº 54/MS/SNVS, de 4 de julho de 1995**, Aprova o Padrão de identidade a Qualidade para Sal Hipossódico, 1995.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Diário Oficial da União, de 11 de março de 1996.

BRASIL, 2000. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 28 de 28 de março de 2000. **Procedimentos básicos de Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos beneficiadores de sal destinado ao consumo humano e o roteiro de inspeção sanitária em indústrias beneficiadoras de sal**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, data 2000.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia Alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**, Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL, 2007. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.092, de 04 de dezembro de 2007. **Institui Grupo Técnico com o objetivo de discutir e propor ações conjuntas a serem implementadas para a melhoria da oferta de produtos alimentícios e promoção da alimentação saudável**. D.O.U - Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, n. 233, 05 de dezembro de 2007, Seção 1, p. 73.

BRASIL, 2008 a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2008b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não-transmissíveis: promoção da saúde**,

vigilância, prevenção e assistência. Brasília, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/>. Acesso em: 22 de agosto de 2013.

BRASIL, 2010. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Termo de compromisso de ajustamento de conduta para informação nutricional.** Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa>. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 54 de 13 de novembro de 2012. **Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2014.

BUEMI, M., SENATORE, M., CORICA, F., ALOISI, C., ROMEO, A., TRAMONTANA, D., & FRISINA, N. Diet and arterial hypertension: is the sodium ion alone important. **Medicinal Research Reviews**, 22, 419-428, 2002.

BURITI, F.C.A, ROCHA, J.S. AND 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, 2005.

CANDY, D.C.A., HEATH, S.J., LEWIS, J.D.N., THOMAS, L.V. Probiotics for the young and the not so young. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, p. 215-221, 2008.

ČERNÍKOVÁ, M.; BUŇKA, F.; POSPIECH, M.; TREMLOVÁ, B.; HLADKÁ, K.; PAVLÍNEK, V.; BŘEZINA, P. Replacement of traditional emulsifying salts by selected hydrocolloids in processed cheese production. **International Dairy Journal**, v.20, p.336-343, 2010.

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

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v.591, p.276-289, 2005.

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

CROSS, M. L.; MORTENSEN, R. R.; KUDSK, J.; GILL, H. S. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. **Medical Microbiology Immunology**, v.191, p.49-53, 2002.

CRUZ, A.G., BURITI, F.C.A., SOUZA, C.H.B., FARIA, J.A.F., SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, p. 344-355, 2009.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; POLLONIO, M. A. R.; BOLINI, H. M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; GRANATO, D.; SHAH, N. P. Cheeses with reduced sodium content: effects on functionality, public health benefits and sensory properties. **Trends in Food Science and Technology**, v.22, p. 276-291, 2011a.

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

DANONE WORLD NEWSLETTER. **Bifidobacteria**. Newsletter, n. 16, nov. 1997. Disponível em: http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_16/sum.html>. Acesso em: 02 de dezembro de 2013.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBAB, M.; DEIDDAB, F.; LORENZINIB, P.; BALLARÉ, M.; MONT INO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from res earch to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 248– 255, 2006.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; CHAVES, S.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; ANTÓINE, J.; PERDIGÓN, G. Effect of long-term continuous consumption of

fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**, v.213, p.97-108, 2008.

DIÁRIO DA SAÚDE, 2012. **Dieta rica em sal descarta cálcio do corpo**. 27 de julho de 2012. Disponível em: www.diariodasaude.com.br. Acesso em: 13 de fevereiro de 2014.

DRAKE, S. L., LOPETCHARAT, K., & DRAKE, M. A. Comparison of two methods to explore consumer preferences for cottage cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n.12, p. 5883-5897, 2009.

DRISKO, J. A.; GILES, C. K.; BISCHOFF, B. J. Probiotics in health maintenance and disease prevention. **Alternative Medicine Review**, v.8, p.143-155, 2003.

ESCALANTE, L. A. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v.21, p.106-114, 2001.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. Acesso em 16 November 2013.

FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods**. 2ª Edição. Estados Unidos da América: Editora CRC Press. p. 581, 2008.

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

FLATCHER, A. **Selako salt replacer targets health-conscious consumers**. Disponível em: <www.foodnavigator.com>. Acesso em: 6 de dezembro de 2013.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Um quarto do sódio ingerido no Brasil vem de comida processada**. 21 de julho de 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2013/07/1314065-um-quarto-do-sodio-ingerido-no-brasil-vem-de-comida-processada.shtml>>. Acesso em: 12 de novembro de 2013.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Substituição de Sódio nos Alimentos**. Nº 25 – 2013. Disponível em: www.revista-fi.com/materias/318.pdf. Acesso em: 17 de fevereiro de 2014.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v.9, p.53-61, 1999.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., AND MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, MD: Aspen Publication, Inc., 2000.

FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos: revisão. **Higiene Alimentar**, v.20, p.22-33, 2006.

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

GELABERT, J., GOU, P., GUERRERO, L., & ARNAU, J. Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. **Meat Science**, v. 65, p.833–839, 2003.

GELEIJNSE, J. M., WITTEMAN, J. C., STIJNEN, T., KLOOS, M. W., HOFMAN, A., & GROBBEE, D. E. Sodium and potassium intake and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: the Rotterdam study, **European Journal of Epidemiology**, v.22, p.763–770, 2007.

GONET-SURÓWKA, A. K.; STRUS, M.; HECZKO, P. B. P1250 influence of *Lactobacilli* probiotic strains on apoptosis of colon cancer cells lines. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p.S343–S344, 2007.

GOU, P., GUERRERO, L., GELABERT, J., & ARNAU, J. Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin. **Meat Science**, v. 42, n.1, p.37–48, 1996.

GRANATO, D.; BRANCO, F. G.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.455-470, 2010a.

GRANATO, D., G.F. BRANCO, A.G. CRUZ, J.A.F. FARIA AND F. NAZARRO. 2010. Functional Foods and Non-Dairy Probiotic Product Development: Trends and Points, Concepts and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.292-302, 2010b.

GOMES, A. P. ; CRUZ, A. G. ; CADENA, R.S. ; FARIA, J. A. F. ; CELEGHINI, R. M. S. ; BOLINI, H. M. A. ; POLLONIO, M. A. R. . Low sodium Minas fresh cheese manufacture: Effect of the partial replacement of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2706-2011, 2011a.

GOMES, A. A. , CRUZ, A. G. , CADENA, R.S. , FARIA, J. A. F. , CARVALHO, C. C. , BOLINI, H. M. A. .2011. Effect of the inoculation level of *L. acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance towards commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 4777-4786, 2011b.

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

HAMILTON-MILLER, J. M. T; GIBSON, G. R; Bruck, W. **Some insight**, v.90, p.845, 2003.

HARTMAN, L. and LAGO, R. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. Lab. Pract, v. 22, p. 475–476, 1973.

HE, T.; PRIEBE, M.G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; ANTOINE, J.-M.; WELLING, G.W.; VONK, R.J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.595-604, 2008.

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

JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. Determination of survival, identity, and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p. 189-194, 2006.

KAMLEH, R.; OLABI, A., TOUFEILI, I.; NAJM, N.E.O.; YOUNIS, T.; AJIB, R. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 1140-1151, 2012.

KARPPANEN, H.; MERVAALA, E. Sodium Intake and Hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Orlando, v. 49, n. 2, p. 59-75, Mar./Apr. 2006.

KIMURA, M., LU, X., SKURNICK, J., AWAD, G., BOGDEN J., KEMP, F., & AVIV, A. Potassium chloride supplementation diminishes platelet reactivity in humans. **Hypertension**, v.44, p.969–973, 2004.

KOLB, H. Die Behandlung acuter Infekte unter dem Gesichtswinkel der Prophylaxe chronischer Leiden. Über die Behandlung mit physiologischen bakterien. **Microecology and Therapeutics**, v.1, p. 15–19, 1955.

KOLLATH, W. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. **Deutsche zahnärztliche Zeitschrift**, v.8, p.7–16, 1953.

KOMATSU, T. R; BURITI, F. C. A; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, jul./set., 2008.

KONGO, J.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed stater culture of Bifidobacterium animalis and Lactobacillus acidophilus in a controlled bioreactor, **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 595–599, 2006.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylatic and therapeutic uses of probiotic: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v.101, p.229-241, 2001.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 211p. 1999.

LEATHERHEAD FOOD RESEARCH, 2011. Future Directions for the Global Functional Foods Market. Disponível em: <http://www.leatherheadfood.com/functional-foods>. Acesso em: 15 de feveferio de 2014.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747–748, 1965.

MA, E. L.; CHOI, Y. J.; CHOI, Y.; POTHOUKAKIS, C.; RHEE, S. H.; IM, E. The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. **International Journal of Cancer**, v.127, p.780-790, 2010.

MACHADO, M. R. G. **Bebida de soja fermentada com Lactobacillus acidophilus: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional**. 2007. 117p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

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.

MARKET AND MARKET, 2013. **Probiotics Market By Products (Functional Foods, Dietary Supplements, Specialty Nutrients, Animal Feed), Applications (Regular, Therapeutic, Preventive Health Care) And Ingredients (Lactobacilli, Bifidobacteria, Yeast) – Global Trends & Forecasts To 2017**. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2014.

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**, p.102, 221, 2005.

MASLOWSKI, K. M.; VIEIRA, A. T.; NG A.; KRANICH, J.; SIERRO, F.; YU, D.; SCHILTER, H. C.; ROLPH, M S.; MACKAY, F.; ARTIS, D.; XAVIER, R. J.; TEIXEIRA, M M.; MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, p.1282-1286, 2009.

MITSUOKA, T. **Intestinal bacteria and health: an introductory narrative**. Japão: Harcourt Brace Jovanovich Japan, 208p. ,1978.

MHURCHU, C. N. Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44000 foods purchased by 21000 households. The **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 93, p. 596-598, 2011.

NAGPAL, R.; YADAV, H.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K.; JAIN, S.; MAROTTA, F. Potential of probiotic and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p. 75-84, 2007.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. Health benefits of dairy foods: an update. **Dairy Council Digest**, v.78, n.6, p.33– 8, 2007.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

ORRHAGE, K.; SILLERSTROM, E.; GUSTAFSSON, J. A.; NORD, C. E.; RAFTER, J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Research**, v.311, p.239-248, 1994.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: Ahmedna, M.; Goktepe, I.; Juneja, V.K. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: CRC Press, Cap. 4, p. 91-108, ISBN: 978-1-4200-2757-0, 2006.

PARODIA, C.G. Desenvolvimento de Queijo Cottage Simbiótico. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D. J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.60-69, 2003.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.166-180, 2009.

PENNA, F. J.; FILHO, L. A. P.; CALÇADO, A. C.; JÚNIOR, H. R.; NICOLI, J. R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, v.76, p.209-217, 2000.

RAFTER, J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 89-94, 2002.

RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. Bifidobacteria and Their Role. Basel: **Birkhäuser Verlag**, 295p., 1983.

REDDY, K. S.; KATAN, M. B. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. **Public Health Nutrition**, v.7, p.167-186, 2004.

REIFF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p. 25-33, 2010.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J. G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology letters**, v. 120, p. 291-296, 1994.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1682S-1687S, 2000.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v.93, suppl. 1, p.S13-S25, 2005

RUDE RK. **Magnesium**. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Baltimore, Mass: Lippincott Williams & Wilkins, p.159-75, 2012.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

SANDERS, M. Use of Probiotics and Yogurts in Maintenance of Health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, p. 71-74, 2008.

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.

SARNO, F., R. M. CLARO, R. B. LEVY, D. H. BANDONI, S. R. G. FERREIRA, and C. A. MONTEIRO. Estimated sodium intake by the Brazilian population, 2002–2003. **Revista de Saúde Pública**, v.43, p. 1–6, 2009.

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.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R. E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 374-382, 2006.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n.11, p. 1262-1277, 2007.

SILVA, L.M.F.; K. S. FERREIRA, K.S. Avaliação de rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo minas frescal, queijo minas frescal “light” e ricotta. **Alimentos e Nutrição**, v.21, p. 437-441, 2010.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.196-203, 2005.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. “Probiotic cheese”. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. (Ed.) Probiotics: a critical review. Wyomondham: **Horizon Scientific Press**, p.57-64, 1999.

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, p. 605-611, 2004.

TAORMINA, P. J. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.50, p.209-227, 2010.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. "**Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) – Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, Analysis, Growth and Forecast, 2012 – 2018**". Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/probioticsmarket.html>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

VAN DENDER, A.G.F.; SPADOTI, L.M.; ZACARCHENCO, P.B., TRENTO, F.K.H.S.; ALVES, A.T.S.; MENDES, T.Q.; ORMENESE, R.C.S.C.; YOTSUYANAGI, K. Optimisation of the manufacturing of processed cheese without added fat and reduced sodium. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.65, p. 217-221, 2010.

VANDENDRIESSCHE, F. Meat products in the past, today and in the future. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1-2, p. 104-113, 2008.

VASILJEVIC, T., & SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714–728, 2008.

VERGIN, F. Anti- und Probiotika. **Hippokrates**, v.25, p.116–119, 1954.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2. ed. New York: Taylor & Francis, cap. 5, p. 175-202, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011. **Review and updating of current WHO recommendations on salt/sodium and potassium consumption**. Geneva, Switzerland. 8pp.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.S451–S455, 2001

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases**, Geneva, 160p., 2003.

Capítulo 2

**Estudo do poder de salga de sais hipossódicos em queijo
Cottage adicionado de bactérias probióticas: ideal de gosto
salgado, estimativa de magnitude e aceitação sensorial**

Manuscrito submetido ao *Journal of Dairy Science*

Resumo

Os consumidores têm buscado cada vez mais alimentos que tragam benefícios para sua saúde. Dessa forma, o consumo de alimentos que apresentam reduzido teor de sódio pode contribuir para a redução do risco de uma série de doenças. O objetivo desse estudo foi avaliar a concentração ideal de NaCl em queijo Cottage probiótico, a equivalência de gosto salgado de 4 formulações contendo diferentes sais-hipossódicos, a viabilidade das culturas probióticas utilizadas, bem como a aceitação sensorial dessas formulações. O ideal de gosto salgado foi determinado usando o teste do ideal com 60 consumidores. As formulações foram avaliadas usando escala linear híbrida de 9cm (“+4=extremamente mais salgada que o ideal”, “-4=extremamente menos salgada que o ideal”). Realizou-se a avaliação do poder de salga de 4 sais-hipossódicos: NaCl:KCl (75:25), NaCl:KCl (50:50), NaCl:KCl:MgCl₂ (50:25:25) e NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5), em relação ao NaCl, utilizando o Método de Estimativa de Magnitude, com 17 provadores. Para avaliar a aceitação sensorial metodologias como análise de penalidades e escala hedônica estruturada de 9 pontos foram utilizadas com 117 consumidores de queijo Cottage. O ideal de gosto salgado para o queijo Cottage probiótico com NaCl foi de 1,12% (p/p), e as concentrações equivalentes em salinidade para todos os sais-hipossódicos avaliados mantiveram-se as mesmas do NaCl (1,12% p/p). Com relação à aceitação sensorial, entre as formulações elaboradas com sais hipossódicos a formulação mais aceita foi aquela com redução de sódio de 25% de NaCl e substituição por KCl (12,5%) e MgCl₂ (12,5%) e o atributo que mais afetou a aceitação dessas formulações foi a textura das amostras. Todas as formulações de queijo Cottage apresentaram potencial probiótico, desde que consumidas numa porção adequada (2 porções diárias de 50 g), uma vez que a concentração manteve-se dentro dos padrões estipulados pela legislação brasileira. Dessa forma, o queijo Cottage probiótico demonstrou ser uma excelente matriz para inserção de sais-hipossódicos, não alterando o poder de salga em relação ao NaCl.

Palavras-Chave: bactérias probióticas • queijo Cottage • redução de sódio • estimativa de magnitude • aceitação sensorial

2.1 Introdução

A busca por alimentos que tragam benefícios à saúde leva ao surgimento de diversos segmentos de consumo, como produtos para dieta e controle de peso, alimentos orgânicos, alimentos funcionais e alimentos com reduzido teor de sódio.

A redução do teor de sódio dos alimentos é atualmente o foco principal da indústria alimentícia, particularmente nos setores de produtos lácteos, cárneos e produtos de panificação, que são pressionados em reformulá-los devido às advertências das agências de saúde pública divulgadas nos meios de comunicação e também pelos consumidores que procuram um estilo de vida mais saudável (DEWITT, 2008). O consumo excessivo de sal está associado com o desenvolvimento de várias complicações de saúde, tais como hipertensão, cálculos renais, e câncer do estômago (DURACK et al., 2008), além de ser prejudicial para a absorção de cálcio no metabolismo humano, o que pode afetar negativamente a saúde dos ossos (KUWABARA, 2010).

Neste contexto, a utilização de substitutos do cloreto de sódio (NaCl) como opção terapêutica para reduzir o consumo de sódio, é relevante. Uma opção atualmente utilizada como substituto do NaCl, são os sais hipossódicos. No Brasil, segundo a portaria da ANVISA (Agência Nacional da Vigilância Sanitária) nº 54, de 04 de julho de 1995, sal hipossódico é definido como um produto elaborado a partir da mistura de cloreto de sódio com outros sais, devendo apresentar teor reduzido de sódio (Na⁺) (50% daquele presente em uma mesma quantidade de NaCl), além de KCl, como ingredientes obrigatórios, de modo que mantenha um poder de salga semelhante ao do NaCl. Porém, outros compostos podem ser adicionados aos sais hipossódicos como, por exemplo, os sais de potássio (sulfato de potássio, acetato de potássio), de cálcio (cloreto de cálcio), de magnésio (cloreto de magnésio e sulfato de magnésio), entre outros. Contudo, a substituição do cloreto de sódio por outros sais, ou a sua simples redução implica em diversas barreiras tecnológicas (CRUZ et al., 2011), já que o sal modifica as interações entre as proteínas, a atividade de água do queijo, as características físicas e de funcionalidade do queijo, além de interferir na atividade microbiana (PASTORINO et al., 2003).

No segmento de alimentos podem ser observados diversos nichos de mercado, dentre os quais os produtos benéficos para o desempenho físico, para a saúde cardiovascular e também para a saúde gastrointestinal, categoria na qual são contemplados os alimentos probióticos (BARBOSA et al., 2010).

Os micro-organismos probióticos têm sido utilizados em diversos produtos, já que o seu consumo em um alimento é uma forma adequada de promover os benefícios esperados. Entre esses produtos tem destaque os produtos lácteos, como leites fermentados, iogurtes e queijos (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Nos últimos anos, muitos estudos têm mostrado que os queijos são eficientes em termos de viabilidade de culturas probióticas, devido às características físico-químicas e sensoriais que tornam estes produtos favoráveis à adição destes micro-organismos (VINDEROLA, PROSELLO, GHIBERTO & REINHEIMER, 2000; KASIMOGLU, GÖNCÜOGLU & AKGÜN, 2004).

O queijo Cottage em virtude da flexibilidade em diversificar seu sabor e forma, alta digestibilidade (em função da fermentação láctica), de baixo valor calórico em comparação com outros tipos de queijo, se encaixa na tendência de consumo de lácteos da linha *light*, representando uma grande vantagem sob os demais (PARODIA, 2010).

Diante disso, nesse capítulo são apresentadas técnicas sensoriais para a determinação da concentração ideal de NaCl em queijo Cottage probiótico e a equivalência de gosto salgado de 4 formulações contendo diferentes sais-hipossódicos. Após a determinações das concentrações, foram aplicados testes de aceitação, a fim de verificar qual concentração representa melhor a preferência dos consumidores. Por fim, objetivou-se ainda, valendo-se da metodologia da análise de penalidades, identificar direções para a melhoria de atributos sensoriais do produto perante aos consumidores.

2.2 Materiais e Métodos

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Embalagem e Estabilidade de Alimentos e Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Tecnologia de

Alimentos (DTA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA). Foram produzidas formulações de queijo Cottage probiótico, nas quais foram variadas as concentrações dos sais adicionados (NaCl, KCl e MgCl₂) bem como a presença ou não de cultura probiótica.

A concentração ideal de NaCl e dos sais KCl e MgCl₂, para o queijo Cottage probiótico, foi calculada com base em testes sensoriais preliminares. Foi realizado um estudo para se obter a intensidade de gosto salgado considerado como ideal para o queijo Cottage probiótico, utilizando-se para isso a “*just-right-scale*” (escala-do-ideal) (MEILGAARD, CIVILLIE, CARR, 1999; DRAKE, 2007).

2.2.1 Culturas empregadas

Como *starter* foi utilizada a cultura lática mesofílica tipo O, composta pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704), e como culturas probióticas – *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Todas as culturas foram obtidas da Christian Hansen (Valinhos, São Paulo, Brasil).

2.2.2 Processamento de queijo Cottage

No processamento do queijo Cottage foram utilizados matéria-prima e produtos conhecidos no mercado pela qualidade, foram seguidas as boas práticas de fabricação e foi realizada a higienização da área de processamento. Todo esse procedimento foi seguido para que fosse possível a obtenção de um produto de boa qualidade com menores riscos de contaminação microbiológica.

O processamento do queijo Cottage foi realizado de acordo com ARAÚJO et al. (2009) com algumas modificações (Fluxograma da Figura 1). Na fermentação de 60L de leite desnatado e pasteurizado (0% de gordura, Tipo A, Xandô, Araras, Brasil), aquecido à temperatura de 37°C, foram adicionados CaCl₂ (0,25g.L⁻¹) e a cultura *starter* composta pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 (Chr Hansen), na forma DVS (*direct vat set*), previamente pesada (5% p/v), correspondendo ao valor de 9 logUFC.g⁻¹ no produto final. Após um período de fermentação de 16h, no qual o pH do leite atingiu um valor de 4.6, houve a formação da coalhada. A massa foi

cortada e em seguida procedeu-se o aquecimento lento até temperatura final de 50°C para a obtenção de grãos firmes e textura compacta. Na etapa seguinte, foi realizado o dessoramento, três lavagens consecutivas da massa com água gelada (3 a 4°C) e adição do *dressing*. Adicionou-se, em relação ao peso final do queijo, 30% de *dressing* (líquido cremoso), composto de creme de leite pasteurizado (17% gordura, Nestlé, Brasil) adicionado de leite desnatado UHT (0% de gordura, Líder, Brasil) para padronizar o teor de gordura até 4% (produto final). No *dressing*, foram adicionadas as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 (Chr Hansen, Valinhos, Brasil), na forma DVS (*direct set vat*), previamente pesadas (5% p/v), de forma a atingir uma contagem final de 9 log UFC.g⁻¹ (de acordo com as recomendações do fabricante).

Para cada tratamento foram adicionados os demais ingredientes diretamente ao *dressing*: sorbato de potássio (0,10% p/p) e os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio (MgCl₂) nas diferentes concentrações (definidas pelos testes do ideal e estimativa de magnitude). Os queijos foram colocados em potes de polipropileno, e imediatamente armazenados em câmara frigorífica a 5°C para resfriamento, de onde foram coletadas as amostras para realização das análises periodicamente.

Os 60L de leite desnatado e pasteurizado utilizados renderam 6.500 ± 0.200 Kg de massa de queijo Cottage por processamento. Sendo que cada Kg de queijo Cottage é composto de 300 g de *dressing*.

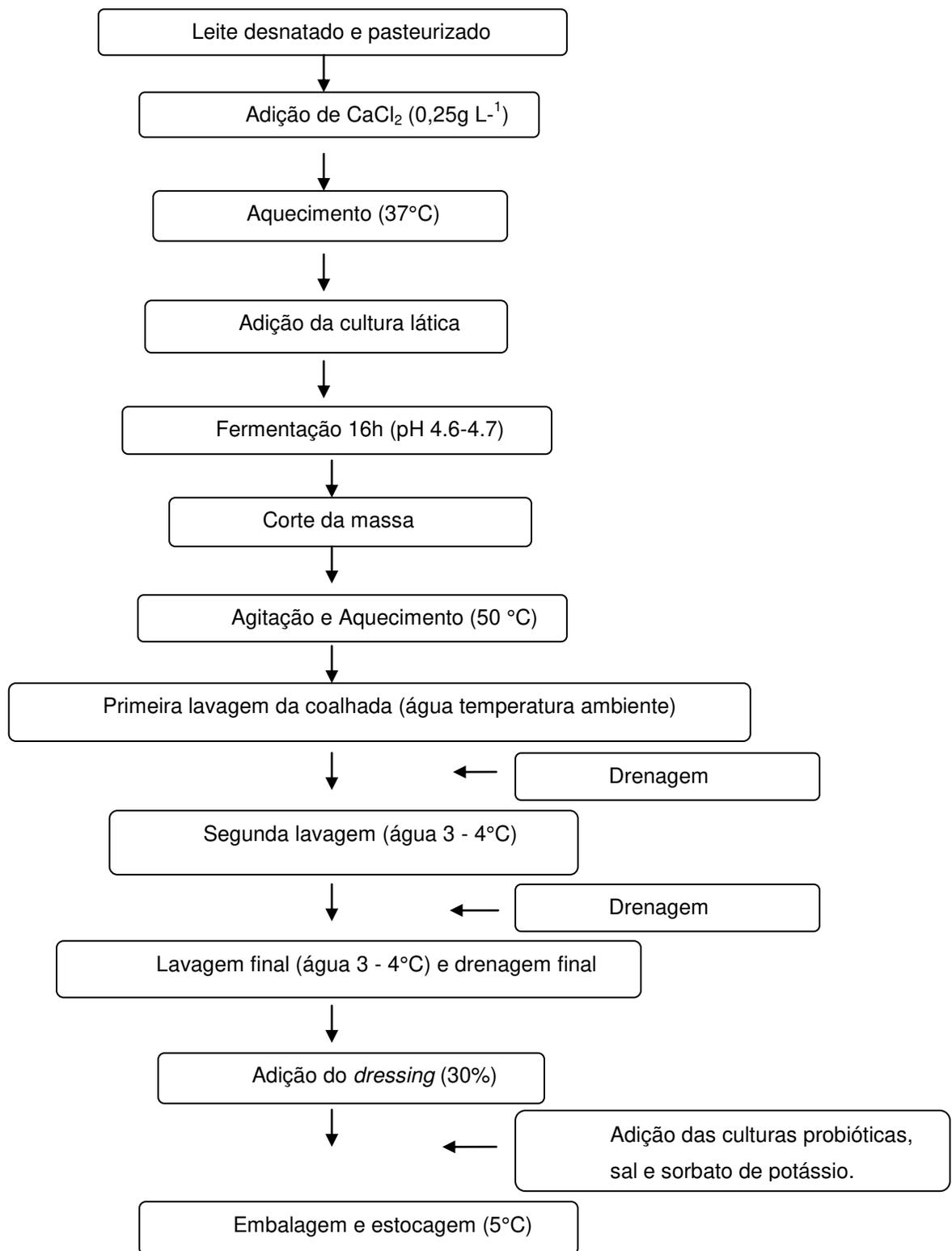


Figura 1: Fluxograma de processamento de queijo Cottage.

2.2.3 Determinação da intensidade ideal de gosto salgado

Inicialmente, foi realizado o estudo para se obter a intensidade de gosto salgado considerado como ideal para o queijo Cottage probiótico, utilizando-se para isso escala do ideal - *Just-about-right* escale ou JAR - (MEILGAARD, CEVILLE & CARR, 1999; DRAKE, 2007).

Foram elaboradas 5 formulações do queijo Cottage probiótico, com diferença apenas em sua concentração de NaCl: 0,5%, 1%, 1,5%, 2% e 2,5% (p/p). O estabelecimento do ponto central das concentrações de NaCl foi definido de acordo com estimativas das quantidades utilizadas normalmente em produtos comerciais e de acordo com pré-testes. As amostras foram servidas aos consumidores em cabines individuais, sendo a apresentação das mesmas realizadas de forma monádica, em copos plásticos descartáveis codificados com algarismos de três dígitos. A ordem de apresentação das amostras avaliadas foi balanceada de acordo com delineamento proposto por MacFie et al (1989).

As análises foram realizadas por 60 consumidores de queijo Cottage, recrutados entre estudantes e funcionários do campus universitário, que avaliaram as amostras utilizando escala híbrida de 9 cm (-4 = "extremamente menos salgada do que o ideal, +4 = "extremamente mais salgada do que o ideal" e "zero" = ideal de gosto salgado).

Os resultados da avaliação sensorial foram avaliados através de análise de regressão linear, seguindo-se metodologia proposta por Vickers (1988). Como variável dependente, foram utilizadas as médias obtidas para cada amostra na escala do ideal; e como variável independente foram utilizadas as concentrações correspondentes de NaCl em cada amostra. A concentração ideal de NaCl para o queijo Cottage probiótico foi calculada utilizando a equação preditiva desenvolvida, considerando-se a variável "y" com valor igual a zero (intensidade ideal). Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o *software* estatístico XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, França).

2.2.4 Determinação da equivalência de gosto salgado.

A determinação da equivalência de gosto salgado foi realizada por 17 provadores pré-selecionados, através da análise seqüencial de Wald (AMERINE et al., 1965), e treinados para utilização da escala de magnitude com amostras de diferentes intensidades de NaCl. O treinamento consistiu de uma explicação da metodologia utilizada, o uso correto da escala (Figura 2), e a explicação da existência de amostras com diferentes intensidades, maiores e menores que o valor da amostra referência.

Nesse estudo seis formulações de queijo Cottage foram avaliadas, e a proporção de sais e de cultura probiótica de cada uma está especificada na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de sais (p/p) de cada formulação de queijo Cottage probiótico.

Formulação	Probiótico*	NaCl	KCl	MgCl ₂
F1	Não	100%	—	—
F2	Sim	100%	—	—
F3	Sim	75%	25%	—
F4	Sim	50%	50%	—
F5	Sim	50%	25%	25%
F6	Sim	75%	12,5%	12,5%

*Culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. (Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). Adicionadas na quantidade de 5%(p/v).

A determinação de equivalência de gosto salgado entre o NaCl e os sais avaliados foi determinada por meio do método de Estimativa de Magnitude (STEVENSON, 1956). Nessa metodologia, para cada sal hipossódico, diferentes concentrações foram testadas (0,5%, 0,75%, 1,12%, 1,68% e 2,52% p/p). A concentração central utilizada foi baseada na concentração ideal de NaCl encontrada através do teste do ideal (1,12% p/p), e para cálculo das demais concentrações foi utilizado o fator de multiplicação de 1,5 (baseado em pré-testes)

A amostra de referência (“R”), que recebeu o valor 100 para intensidade do gosto salgado, foi adicionada de NaCl na concentração em que se desejava determinar na equivalência de gosto salgado (1,12%p/p). Essa amostra de referência (R) estava presente entre as amostras codificadas.

O poder de salga de todos os níveis de concentração para cada sal hipossódico foi avaliado em sessões de teste, que ocorreram em dias distintos. À exceção da referência (“R”), todas as demais amostras foram codificadas com algarismos de três dígitos e servidas em ordem balanceada de acordo com delineamento proposto por MacFie et al (1989).

As funções de potência de cada sal hipossódico foram determinadas conforme descrito por Moskowitz, 1970. Assim, inicialmente foi calculada a média geométrica dos resultados de todas as concentrações de um mesmo julgador, seguida pela normalização dos dados, que consistiu na divisão do valor dado pelo provador para cada amostra pela sua média geométrica anteriormente definida. Posteriormente, foi calculada a média geométrica dos valores normalizados de todos os provadores para uma mesma concentração.

Os valores de magnitude de gosto salgado estimados foram convertidos para valores logarítmicos e expressos utilizando média geométrica. As curvas para concentração versus resposta sensorial, para cada sal hipossódico foram correspondentes a uma função de potência (“power function”) com a seguinte característica: $S = a \cdot C^n$, onde **S** é a sensação percebida, **C** é a concentração do estímulo, **a** é o antilog do valor de y no intercepto e **n** é o coeficiente angular da reta obtida (MOSKOWITZ, 1974).

Teste de Escala de Magnitude

Nome: _____ Data: __/__/__

Você está recebendo uma amostra referência especificada com a letra "R" e seis amostras codificadas. Prove primeiramente a amostra referência "R", dando a ela o valor 100 para intensidade do gosto salgado. Em seguida, prove as amostras codificadas da esquerda para a direita e avalie a intensidade do gosto salgado de cada uma comparativamente à amostra "R". Por exemplo, se a intensidade do gosto salgado da amostra codificada for 2 vezes superior a "R", dê a ela o valor 200; se ele for duas vezes inferior à amostra "R", dê a ela o valor 50.

AMOSTRA	VALOR
R	100
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários: _____

Figura 2: Ficha do teste de estimativa de magnitude.

2.2.5 Análise de aceitação

A análise sensorial foi constituída de um teste afetivo. Os testes afetivos medem: o grau com que consumidores gostam ou desgostam de determinado produto, e a preferência que o consumidor assume sobre um produto com relação a outro (MEILGARRD, CIVILLE & CARR, 1999; DRAKE, 2007).

Entre os métodos sensoriais existentes para medir a aceitação e a preferência de um grupo de provadores, testes com escala hedônica de nove centímetros são os mais aplicados, devido à sua simplicidade, confiabilidade e validade de seus resultados (STONE e SIDEL, 1993). Esta é facilmente entendida pelos consumidores, onde o provador receberá as amostras codificadas, e será solicitado a avaliar o quanto ele gosta ou desgosta de cada amostra, podendo utilizar-se de uma escala estruturada ou não estruturada.

Esse teste foi realizado com 117 consumidores potenciais de queijo Cottage. Forão avaliados os seguintes atributos: aparência, cor, aroma, sabor, textura e impressão global dos queijos utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos, sendo os extremos da escala: 1 = “desgostei extremamente” e 9 = “gostei extremamente” (MEILGAARD et al., 2007). Os efeitos *first-order-carry-over* foram balanceados através de delineamento publicado por MACFIE et al., 1989. Adicionalmente, a intenção de compra foi avaliada utilizando escala binomial sim/não. Juntamente com as 6 formulações desenvolvidas nesse estudo, foram utilizados dois queijos Cottage comerciais (um queijo Cottage convencional e um queijo Cottage probiótico formulado com *Lactobacillus acidophilus*). Esses queijos foram adquiridos em supermercados da Cidade de Campinas-SP no início da vida de prateleira.

Os dados obtidos no teste de aceitação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes de médias de Tukey, onde se verificou a ocorrência de diferença significativa entre as médias, em um determinado nível de confiança de 95% (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999; STONE e SIDEL, 1993). Os cálculos foram realizados usando os procedimentos do programa SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2.

Os dados da análise sensorial de aceitação em relação à aceitação global foram também analisados por análise estatística multivariada (Mapa de Preferência Interno), realizado através do *software* estatístico XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, França).

2.2.6 Análise de penalidades (*Penalty analysis*)

As principais funções dos testes afetivos são a manutenção da qualidade do produto, a otimização de processos e/ou o desenvolvimento de novos alimentos. (CERVANTES, 2010). Portanto, tornam-se necessários diversos métodos de análise sensorial para se introduzir um alimento novo, com sucesso, no mercado consumidor. Dentre os métodos importantes vale ressaltar a escala hedônica, escala do ideal e os testes de penalidades (“*penalty analysis*”) (ALBUQUERQUE et al., 2009; BARBOZA et al., 2003; CERVANTES, 2010).

A metodologia de *penalty analysis* é utilizada para a identificação de potenciais direções para a melhoria de produtos. Para a aplicação de tal metodologia, são utilizados os dados de preferência (ou gostar) que expressam a satisfação global do consumidor em relação a um produto; e aqueles obtidos pela escala JAR (*Just About Right*), que indicam o quão ideal um produto está em relação ao esperado pelo provador. O método baseia-se em comparações múltiplas e consiste em identificar se as classificações na escala JAR estão relacionadas aos resultados significativamente diferentes das médias de escala hedônica. A palavra *pênalti* está relacionada ao fato de estar se observando as características/atributos que podem penalizar a satisfação do consumidor em relação a um determinado produto. (CERVANTES et al., 2010).

Esse teste foi realizado juntamente com o teste de aceitação utilizando os 117 consumidores de queijo Cottage. Foram avaliados os seguintes atributos: ideal de gosto salgado, gosto ácido e textura utilizando a escala do ideal (*Just About Right*) de 9 pontos: 1 = “extremamente menos que o ideal”, 5 = “ideal” e 9 = “extremamente mais que o ideal” (MEILGAARD et al, 1999). Juntamente com as 6 formulações foram utilizados dois queijos Cottage comerciais (um queijo Cottage convencional e um queijo Cottage probiótico formulado com *Lactobacillus acidophilus*) adquiridos em supermercados da Cidade de Campinas-SP no início da vida de prateleira.

Finalmente, a análise de penalidades (DRAKE et al., 2011) foi realizada para chegar a conclusões acerca dos efeitos de uma variável JAR na impressão global, identificando diminuições na aceitabilidade associados a atributos sensoriais que não se encontram a níveis ótimos em um produto.

Os dados obtidos foram avaliados pelo *software* estatístico XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, França).

2.2.7 Avaliação da viabilidade das culturas *starter* e das culturas probióticas.

A viabilidade da cultura *starter* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, e das culturas probióticas de

Lactobacillus acidophilus La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr Hansen, Valinhos, Brasil) foram monitoradas durante o período de estocagem refrigerada do queijo Cottage, nos dias 1, 14, e 28.

A contagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 foi realizada por plaqueamento em profundidade de 1 mL de cada diluição em Ágar M17 (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), com adição de 5%(v/v) de solução de lactose a 10%(p/v), seguida de incubação aeróbica a 30 °C/ 48 horas (IDF, 1997). As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata. Após o período de incubação, a contagem de células viáveis foi realizada e expressa como log de unidades formadoras de colônia por grama (log UFC g⁻¹).

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado o meio MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) com 10% (v/v) de solução de maltose 20% (p/v) (IDF, 1999). *Bifidobacterium animalis* foi enumerada utilizando MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) com adição de 100 mL de solução de glicose a 20%(p/v), 5 mL de solução de dicloxacilina 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. Posteriormente a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (Oxoid, São Paulo, SP) a 37 °C por 72 horas (CHRISTIAN HANSEN, 1999). A contagem de células viáveis foi realizada e expressa como log de unidades formadoras de colônia por grama (log UFC. g⁻¹).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Determinação da intensidade ideal de gosto salgado

Teste com escala do ideal é uma das técnicas mais utilizadas para se obter informações sobre a percepção do consumidor sobre os atributos sensoriais do produto, devido a sua simplicidade, facilidade de uso, confiança e validade dos resultados e aplicabilidade em inúmeras situações (POPPER e KROLL, 2005). É um método sensorial muito utilizado no desenvolvimento e pesquisa de marketing, para o aumento ou redução nos níveis de atributos específicos dos produtos, até

que se atinjam as concentrações consideradas ótimas e ideais para o consumidor (BOWER e BOYD, 2003).

O teste da escala do ideal permitiu verificar a opinião dos provadores a respeito da intensidade ideal de gosto salgado de queijo Cottage probiótico adicionado de NaCl. Os dados subjetivos foram transformados em valores numéricos correspondentes às categorias presentes na escala utilizada, de forma que a categoria “extremamente mais salgada que o ideal” correspondia ao valor +4, “extremamente menos salgada que o ideal”, ao valor -4 e a gosto salgado “ideal” correspondia ao valor 0.

Os resultados da avaliação sensorial foram analisados através de regressão linear, seguindo-se metodologia proposta por Vickers (1988). Calculou-se a média ponderada das notas dadas pelos provadores para cada concentração de NaCl utilizada (0,5%, 1%, 1,5%, 2% e 2,5% p/p). Como variável dependente, foram utilizadas essas médias obtidas, e como variável independente, foram utilizadas as concentrações correspondentes de NaCl em cada amostra. A concentração ideal de NaCl para o queijo Cottage probiótico foi calculada através da equação preditiva desenvolvida ($y = 201,27x - 2,2617$), considerando-se a variável “y” com valor igual a zero (intensidade ideal).

A Figura 3 mostra que através do cálculo de médias, intercepção e inclinação, obteve-se uma reta, a partir da qual foi possível determinar que o ideal de NaCl a ser adicionada ao queijo Cottage probiótico era de 1,12%(p/p).

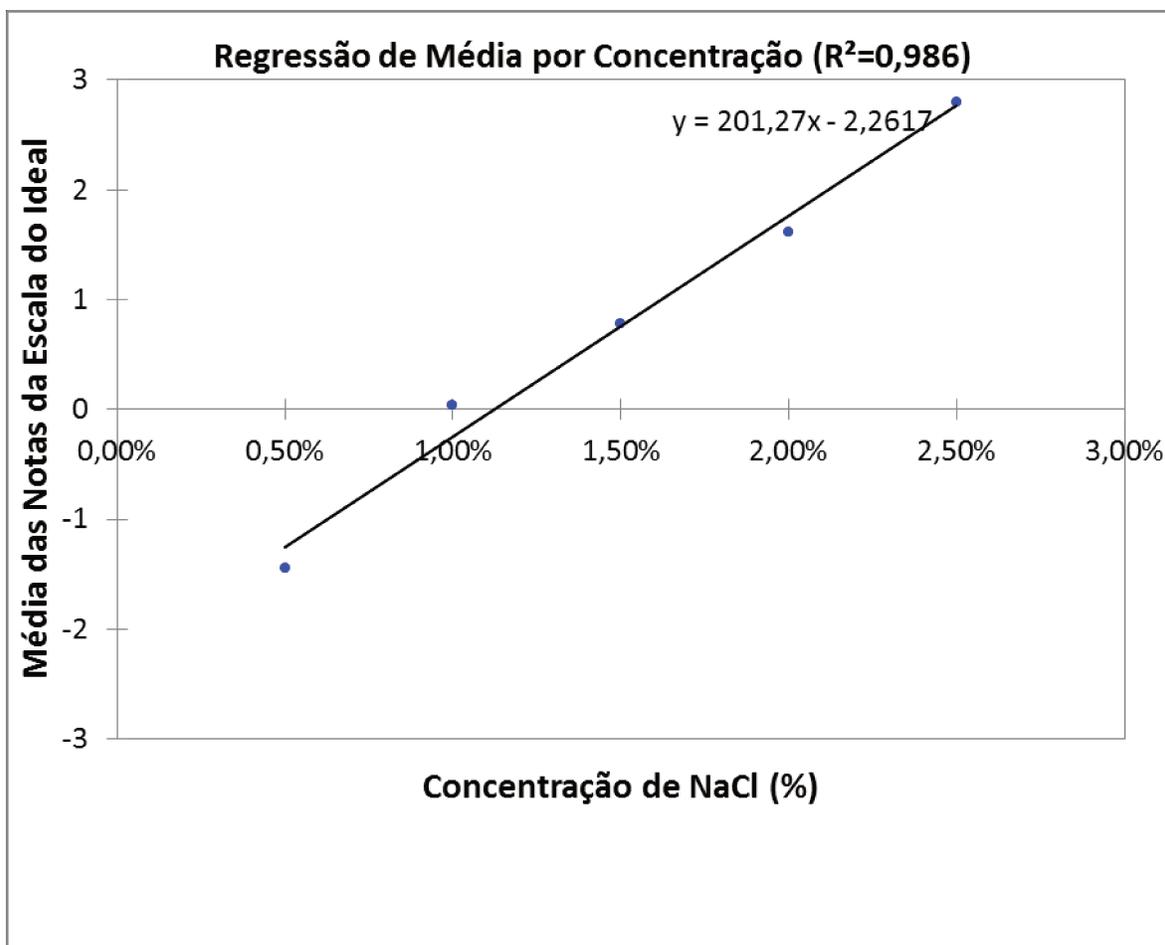


Figura 3. Gráfico e Equação da reta no teste para determinação da concentração ideal de NaCl adicionada ao queijo Cottage probiótico, obtida no teste de escala do ideal.

A partir da concentração de NaCl obtida pelo teste de escala do ideal, foi utilizada a metodologia de estimativa de magnitude para determinar as concentrações dos sais hipossódicos a serem adicionadas para provocar a mesma intensidade de gosto salgado equivalente a 1,12%(p/p) de NaCl.

2.3.2 Determinação da equivalência de gosto salgado

Com a intenção de substituir o NaCl com sucesso, é necessário que se conheça previamente as concentrações adequadas a serem utilizadas para fornecer uma intensidade de gosto salgado equivalente à do NaCl no produto em questão. Uma das metodologias utilizadas para obtenção desta informação é a

Estimativa de Magnitude e apresentação gráfica dos resultados normalizados utilizando a Lei de Steven ou “Power Function” (STONE E OLIVER, 1969; MOSKOWITZ, 1970; CARDOSO E BOLINI, 2007).

A Estimativa de Magnitude tem sido empregada mais recentemente para se determinar a equivalência de gosto salgado de diferentes sais em manteiga (SOUZA et al., 2013) e em *cream cheese* (SILVA et al., 2013).

Para a análise dos dados, calculou-se a média geométrica dos valores dados por cada um dos 17 provadores (pré-selecionados e treinados). Depois, realizou-se a normalização dos resultados de cada provador, dividindo o valor dado por cada provador pela sua respectiva média geométrica. Com os dados normalizados, os resultados de todos os provadores seguiram para o cálculo de média geométrica de cada concentração da NaCl e dos diferentes sais hipossódicos, os quais foram especificados na Tabela 1.

Com isso foram determinados os valores de coeficiente angular, intercepto na ordenada e coeficiente de correlação linear, conforme Tabela 3. A reta encontrada é o resultado linearizado da função de potência simples $S = a \cdot C^n$, conhecida como Lei de Stevens ou “Power Function” (MOSKOWITZ, 1974), onde **S** é a sensação percebida pelos provadores, **C** é a concentração do estímulo (sais), **a** é o antilog do valor y no intercepto e **n** é o coeficiente angular da reta obtida.

Os resultados obtidos para cada formulação de sal foram analisados pelo *software* estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2 e são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de Coeficiente Angular, Intercepto na Ordenada, Coeficiente de Correlação Linear e Função de Potência (“Power Function”), obtidos nos testes utilizando escala de magnitude, para determinar as equivalências de gosto salgado dos sais hipossódicos em relação à concentração de 1,12% (p/p) de NaCl em queijo Cottage probiótico.

Formulação*	Coeficiente angular	Intercepto na ordenada	R ²	Função de Potência (“Power Function”)
F1	1,1894	-1,2489	0,9951	S= 0,0563. C ^{1,1894}
F2	0,9504	-0,9980	0,9879	S= 0,1004. C ^{0,9504}
F3	1,0702	-1,1237	0,9944	S= 0,0752. C ^{1,0702}
F4	1,1351	-1,1918	0,9817	S= 0,0642. C ^{1,1351}
F5	1,0210	-1,0720	0,9885	S= 0,0847. C ^{1,0210}
F6	0,9163	-0,9621	0,9960	S= 0,1091. C ^{0,9163}

*Formulação: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos). **S**= Estímulos Percebidos como Sensações. **C** = Concentração Utilizada.

A análise da Tabela 2 permite verificar que foram obtidos ótimos valores de correlação na regressão linear, acima de 0,9 para todos os sais analisados. Apesar disso, percebe-se que para a formulação F4 o valor de r foi mais baixo, sendo essa formulação a que apresentava 50% de KCl como sal substituto.

A presença de amargor, sabor metálico e adstringente são atributos sensoriais muitas vezes citados em trabalhos que utilizam KCl e MgCl₂ como sais substitutos do NaCl. Porém, nesse estudo com queijo Cottage probiótico, entre os 17 provadores que faziam parte da equipe sensorial, apenas um provador citou o atributo sabor metálico nas formulações que apresentavam MgCl₂ como sal substituto. De acordo com Grummer et al. (2012), CaCl₂ e MgCl₂ produzem off-flavors (amargo, metálico) em queijo. De acordo com Armenteros et al. (2012), cátions bivalentes, podem contribuir para a rejeição sensorial, uma vez que são caracterizados por produzirem sabores amargos, metálico, sensações adstringentes e irritantes.

A relação entre intensidade de gosto salgado e a concentração para as substâncias estudadas está representada graficamente, em escala logarítima, na Figura 4, onde é possível verificar as curvas bem ajustadas para o NaCl e os demais sais.

A determinação da intensidade ideal de gosto salgado realizada utilizando a escala do ideal ofereceu o valor da concentração ideal (C) de NaCl. Com a reta obtida para este ingrediente, foi possível aplicar a função de potência apresentada na Tabela 2, e obter a sensação de gosto salgado (S). Esse valor (S) obtido para o NaCl foi substituído pela equação de cada sal, e conforme Tabela 3, foram determinadas assim suas concentrações equivalentes.

Aplicando a Função de Potência utilizando a concentração de 1,12% (p/p), encontrada pelo teste do ideal, obteve-se o resultado para a sensação percebida de 0,9974. Utilizando este valor (S) na função de potência da formulação 4 (F4), juntamente com os demais parâmetros colocados anteriormente na Tabela 2, obteve-se a concentração de 1,12 g, ou seja, a concentração necessária de NaCl/KCl (50:50) para promover a mesma sensação de gosto salgado promovida pela concentração de 1,12% (p/p) de NaCl.

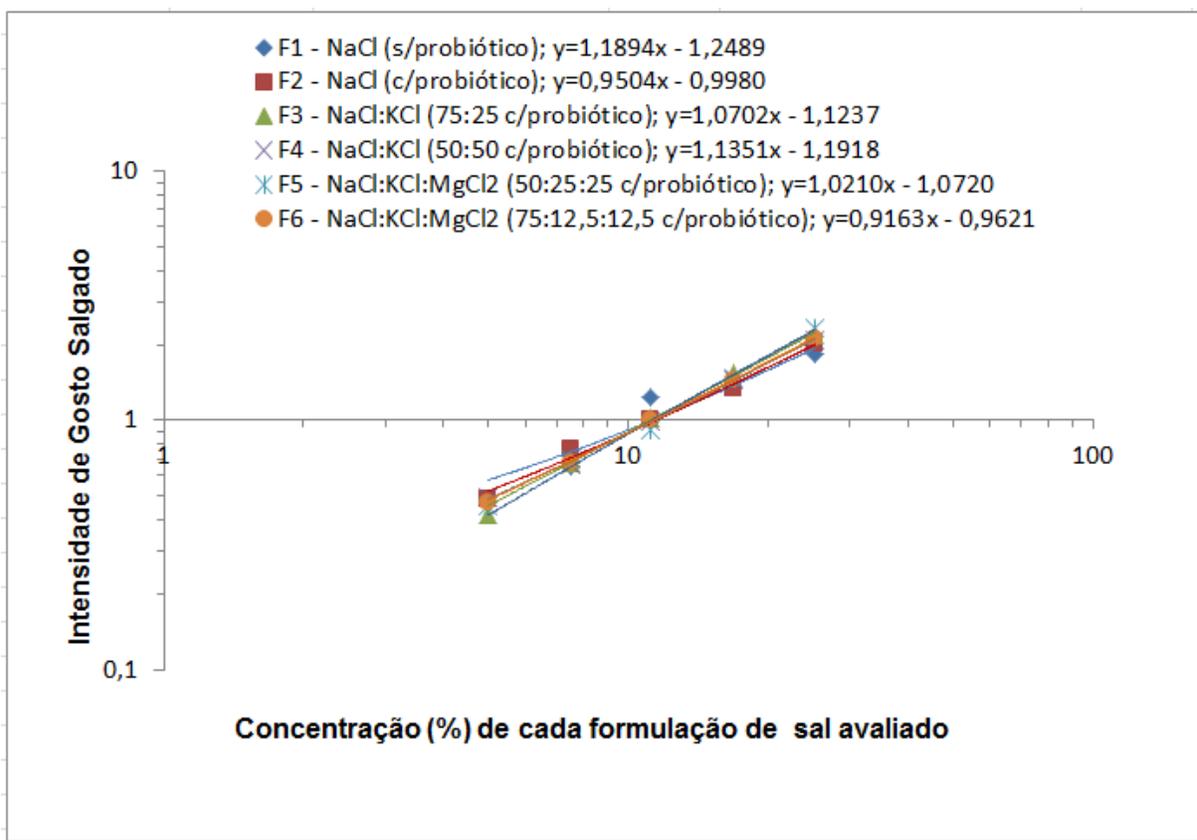


Figura 4: Relações entre as intensidades de gosto salgado e as concentrações dos sais correspondente à concentração de NaCl de $1,12g.100g^{-1}$.

Os valores da concentração de cada sal hipossódico, adicionados ao queijo Cottage, para promover a mesma intensidade de gosto salgado determinada pelo teste do ideal (1,12%p/p), estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração dos sais equivalente a 1,12% (p/p) de NaCl em queijo Cottage probiótico

Sais	Concentrações equivalentes a 1,12% (p/p) de NaCl em queijo Cottage probiótico
(F1) NaCl	1,12% ^{a**}
(F2) NaCl *	1,12% ^{a**}
(F3) NaCl:KCl (75:25)*	1,11% ^{a**}
(F4) NaCl:KCl (50:50)*	1,12% ^{a**}
(F5) NaCl:KCl:MgCl ₂ (50:25:25)*	1,11% ^{a**}
(F6) NaCl:KCl:MgCl ₂ (75:12,5:12,5)*	1,11% ^{a**}

*Culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. (Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). Adicionadas na quantidade de 5%.

**Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey. Os resultados aqui apresentados se referem à média de 2 repetições.

Analisando os resultados, pode-se observar que as concentrações equivalentes de percepção de salinidade para todos os sais hipossódicos avaliados mantiveram-se as mesmas encontradas através da escala do ideal, o que diverge de alguns resultados encontrados na literatura. A possível explicação para este fato é que, em geral, percebe-se uma diminuição do gosto salgado no alimento quando misturado com ácido, o que se enquadra no caso do queijo Cottage que apresenta um pH considerado ácido (4,6) resultante do seu processo de fermentação no qual são produzidos ácidos orgânicos a partir da fermentação da lactose pela cultura starter. A intensidade de percepção do Na⁺ pelas células receptoras é inibida em pH mais ácido, principalmente quando há a mistura de NaCl com ácidos orgânicos (DESIMONE et al., 2006).

Outros tipos de produtos lácteos também foram estudados com relação à substituição de NaCl por outros sais. Em um dos estudos desenvolvidos por Silva et al, (2013) usando o método de estimativa de magnitude, foram determinadas as potências de KCl, glutamato monossódico e fosfato de potássio em relação ao NaCl a 1% em manteiga. Em seus resultados as autores afirmam que o NaCl e o

KCl tem um poder de salga semelhante , o que significa que uma concentração semelhante desses sais produz a mesma sensação de sabor salgado.

Outro estudo foi desenvolvido por Silva et al.,(2013), usando o mesmo método de estimativa de magnitude com o objetivo de se determinar a potência e a equivalência de substitutos de NaCl a 1% (cloreto de potássio, cloreto de magnésio, glutamato monossódico, lactato de potássio, lactato de cálcio e fosfato de potássio monobásico) em *cream cheese*. Os resultados demonstraram que para os sais NaCl e KCl, a proximidade das curvas resultantes indicam que a quantidade de KCl necessária para produzir a mesma intensidade de gosto salgado que o NaCl foi semelhante. Entretanto para o sal $MgCl_2$ foi necessária uma quantidade duas vezes maior para produzir a mesma intensidade de gosto salgado, porém, nesses estudos é importante salientar que os sais substitutos foram utilizados isoladamente e não como substitutos parciais como é proposto pela legislação brasileira (BRASIL, 1995)

A percepção do sabor salgado do NaCl é atribuída ao cátion (70-85 %) e para o ânion (30-15%) (FORMAKER & HILL, 1988; MATTES, 2001) envolvendo a passagem de íons através de um canal iônico estreito. De acordo com Mccaughy (2007), esta passagem por esses canais é uma especificidade dos íons de NaCl , sendo difícil encontrar outras substâncias com esta capacidade, exceto íons tóxicos. Assim, a capacidade de salga depende do tipo de cátion / ânion presente na substância (YE et al . 1991, 1993). Num estudo de Phan et al. (2008) concluiu-se que a libertação de sódio durante a mastigação é influenciada fundamentalmente pela estrutura e composição do queijo, em particular pelo teor de umidade, enquanto a percepção do sabor salgado é limitada pela presença da gordura. Consequentemente, pôde concluir-se que a via de redução de sal em queijo sem afetar o sabor seria aumentar o teor em umidade e decrescer a quantidade de gordura. Tais resultados se enquadram no caso do queijo Cottage probiótico desse estudo, o qual apresentou teor de umidade em torno de 75% e teor de gordura de 4,4%.

Cabe ressaltar a escassez de estudos sobre o comportamento desses sais substitutos do NaCl, quando adicionados em queijos com baixo teor de gordura e com probióticos.

2.3.3 Análise de aceitação.

A análise de aceitação das formulações de queijo Cottage probiótico foi realizada após o primeiro dia de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tal análise foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Ciências Médicas-UNICAMP (Anexo A). Para esse fim, foi empregado o teste de aceitação (Modelo de ficha utilizada no teste – Anexo B). Os resultados dos testes foram avaliados por análise estatística univariada (análise de variância - ANOVA) e teste de médias de Tukey (a 5% de significância). Os cálculos foram realizados usando os procedimentos do programa SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2.

O teste de aceitação foi realizado com 117 consumidores de queijo Cottage, alunos e/ou funcionários da UNICAMP, na faixa etária de 18 a 44 anos, sendo 73% de indivíduos do gênero feminino e 27% do gênero masculino.

A Tabela 4 apresenta os valores médios dos atributos para cada formulação. Como pode ser observado, em relação à aparência, a formulação F2 (NaCl 100% com probióticos) diferiu ao nível de significância de 5% das demais formulações, sendo a formulação que recebeu o valor mais baixo na média das avaliações dos consumidores (4.86), sendo a menos aceita. A avaliação da formulação menos aceita confirmou que a presença de soro e a aparência pastosa, que caracterizou a formulação F2 na análise de comentários realizada pelos consumidores (mesma ficha do teste de aceitação), podem ter influenciado o consumidor na avaliação negativa dessa formulação.

Nota-se que C1 foi a formulação que recebeu a maior média hedônica para o atributo aparência (7.17), não diferindo significativamente ($p>0,05$) da formulação C2, F6 e F5, entretanto, foi estatisticamente diferente de todas as outras formulações.

Analisando a aceitação quanto ao aroma, a formulação C1 recebeu a maior média (7.06), de acordo com a avaliação dos consumidores, não diferindo

significativamente ($p>0,05$) da formulação F4 (substituição de 50% de NaCl por KCl), porém, diferiu ao nível de significância de 5% das demais formulações que obtiveram ligeira aceitação com relação ao atributo aroma.

Com relação ao atributo sabor, a formulação C1 (comercial convencional) foi preferida entre os consumidores (6.68), todavia não diferindo ao nível de significância de 5% das formulações F1, F3 e F6. As formulações F3 e F6 foram as que tiveram redução de 25% da quantidade de NaCl e substituição parcial pelos sais KCl e $MgCl_2$ (F6). Apesar da substituição, elas apresentaram boa aceitação com relação ao atributo sabor senso as formulações mais citadas com relação a esse atributo na análise de comentários dos consumidores.

Ainda a respeito ao sabor, a formulação F5 (NaCl/KCl/ $MgCl_2$ na proporção de 50:25:25 com probióticos) foi a que apresentou maior média de rejeição (5.53), porém, não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) das formulações F2, F4 e C2. Essa média pode ser explicada pelo atributo “sem sal” e pelo “gosto ácido” que foram as características que os consumidores atribuíram ao que eles não gostaram nessas formulações. Pela escala hedônica, a nota média obtida situou-se entre 5.0 e 6.0, compreendendo os termos “não gostei/nem desgostei” e “gostei ligeiramente”.

Ainda de acordo com a Tabela 4 avaliando a textura, percebe-se que as formulações C1, C2, F4 e F5 receberam as maiores médias e não diferiram ao nível de significância de 5% entre si. Novamente, a formulação F2 foi a que recebeu a menor média (4.96), com diferença estatística significativa ($p<0,05$) das demais formulações. Na análise de comentários realizada pelos consumidores com relação à textura, o atributo que desagradou os consumidores foi a textura “mole” dessa formulação. Quando comparada à produção industrial, as formulações feitas em laboratório podem apresentar médias menores quando se refere à textura, pois o modo de produção das formulações feitas em laboratório se apresenta de maneira mais artesanal, sendo difícil a padronização do tamanho dos grãos do queijo.

Quando analisou-se a Impressão Global dos consumidores sobre as formulações, pôde-se visualizar na Tabela 4 que as formulações C1, C2 e F6 foram as preferidas e mais aceitas, não diferindo significativamente ($p>0,05$) entre

si, sendo que a formulação F6 (NaCl:KCl:MgCl₂; 75:12,5:12,5 com probióticos), foi a que obteve melhor aceitação global (6.42). Gomes et al.,(2011) em um trabalho com queijo Minas Frescal demonstraram que a substituição parcial de NaCl por KCl é viável pois o teste de consumidor indicou que é possível fabricar um queijo fresco tipo Minas frescal com substituição parcial (25% p/p) de NaCl por KCl com boa aceitação sensorial.

As formulações F2 e F5 não diferiram entre si ($p>0,05$) e foram as que receberam avaliação inferior dos consumidores, porém, pela escala hedônica, a nota média obtida situou-se entre 5.5 e 5.8, compreendendo o termo “não gostei/nem desgostei”.

Os resultados de aparência e textura provavelmente influenciaram os resultados de aceitação global para essa formulação F2. Para a formulação F5, onde houve redução de 50% de NaCl, os resultados condizem com os resultados encontrados por Wyatt (1983) que observou que em queijo Cottage uma redução de 35% na quantidade de NaCl (de 1 a 0,65%) não influenciou a avaliação pelos consumidores, apesar da redução de 50% ter resultado numa baixa aceitação relativamente ao queijo controle.

Igualmente aos resultados apresentados nesse estudo, Soares (2012), em um trabalho com queijo São João (queijo tradicional português, curado, de pasta mole) demonstrou que entre os queijos salgados com mistura NaCl/KCl, os queijos com a substituição de 25% KCl obtiveram uma pontuação mais elevada no sabor, bem como nos parâmetros da aparência, textura, consistência e pasta, comparativamente ao queijo controle, apesar de não terem sido percebidas diferenças apreciáveis ($p>0,05$) entre a modalidade experimental e o queijo controle. Segundo alguns autores, o NaCl pode mascarar defeitos de sabor, porém este efeito é dependente do teor de sal adicionado e dos tipos de compostos químicos produzidos durante o tempo de prateleira (KATSIARI et al., 1998). O fato pelo qual o queijo salgado com NaCl/KCl (3:1) não exibir um sabor amargo/metálico pode ser atribuído ao efeito “máscara” do NaCl sobre o KCl (KATSIARI et al., 1998).

Adicionalmente, os consumidores avaliaram a intenção de compra do produto em uma escala tipo binomial (sim/não) (SOLER, 2005). Os resultados apresentados na Tabela 5 revelam que as formulações C1, C2 e F6, além de serem as preferidas pelos consumidores, foram as formulações que mais de 50% dos consumidores, 71.19%, 55.08% e 53.39%, relataram que comprariam.

Tabela 4: Média dos consumidores para cada um dos atributos avaliados

Formulação*	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global
F1	6.18 ^d	6.48 ^{b,c}	6.44 ^{a,b}	5.76 ^c	6.28 ^{b,c}
F2	4.86 ^e	6.21 ^c	5.98 ^{b,c}	4.96 ^d	5.57 ^d
F3	6.33 ^{c,d}	6.43 ^{b,c}	6.25 ^{a,b}	6.20 ^{b,c}	6.29 ^{b,c}
F4	6.60 ^{b,c,d}	6.66 ^{a,b}	6.05 ^{b,c}	6.49 ^{a,b}	6.29 ^{b,c}
F5	6.70 ^{a,b,c,d}	6.48 ^{b,c}	5.53 ^c	6.35 ^{a,b,c}	5.85 ^{d,c}
F6	6.80 ^{a,b,c}	6.55 ^{b,c}	6.41 ^{a,b}	6.16 ^{b,c}	6.42 ^{a,b}
C1	7.17 ^a	7.06 ^a	6.68 ^a	6.89 ^a	6.85 ^a
C2	6.93 ^{a,b}	6.36 ^{b,c}	6.03 ^{b,c}	6.71 ^{a,b}	6.40 ^{a,b}

Médias com letras em comum na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as formulações ($p \leq 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey. ***Formulação:** **F1:** NaCl sem probióticos. **F2:** NaCl com probióticos. **F3:** NaCl/KCl (75:25 com probióticos). **F4:** NaCl/KCl (50:50 com probióticos). **F5:** NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). **F6:** NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos). As formulações comerciais de queijo Cottage C1 e C2 são: C1 = queijo Cottage convencional e C2 = queijo Cottage probiótico com *Lactobacillus acidophilus*.

Tabela 5: Atitude de compra em relação às formulações avaliadas

Formulação	Comprariam (%)	Não comprariam (%)
F1	50.85	49.15
F2	35.59	64.41
F3	50.85	49.15
F4	48.31	51.69
F5	39.83	60.17
F6	53.39	46.61
C1	71.19	28.81
C2	55.08	44.92

*Formulação: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos). As formulações comerciais de queijo Cottage C1 e C2 são: C1 = queijo Cottage convencional e C2 = queijo Cottage probiótico com *Lactobacillus acidophilus*.

2.3.4 Mapa de preferência interno

Os dados da análise sensorial de aceitação em relação à aceitação global foram analisados também por análise estatística multivariada (Mapa de Preferência Interno), realizada através do *software* estatístico XLSTAT 2012 (Addinsoft, Paris, França).

Aliada à análise de variância e testes de médias, o Mapa de Preferência Interno pode complementar a análise de aceitação de um produto, permitindo conhecer a preferência individual dos consumidores ou grupo de consumidores em relação ao conjunto total deles, algo que não é possível quando se faz uma análise através das médias de avaliação (CADENA e BOLINI, 2011). Neste tipo de análise, os critérios avaliados são identificados como dimensões que ocupam posições ortogonais em uma representação gráfica, permitindo que as amostras sejam representadas como pontos e os consumidores, com critério principal de preferência, como vetores (COSTELL et al., 2000).

O Mapa de Preferência (MDPREF) é gerado a partir das respostas dos consumidores com relação à impressão global sobre o produto. A Figura 5 apresenta o MDPREF bidimensional, a qual suas duas dimensões explicam 46,22% das variações observadas entre as formulações.

O valor relativamente baixo pode ser explicado pela existência de mais de uma formulação com alto grau de preferência, ou seja, a preferência dos consumidores esteve dividida entre mais de uma formulação.

No gráfico obtido na Figura 5, os consumidores ficaram localizados próximos das formulações de sua preferência e foi possível observar maior distribuição dos provadores na região positiva da Dimensão 1. Também distribuídos em sua maioria na região positiva da Dimensão 2, onde pode-se observar a alocação das formulações C1 e C2, indicando maior preferência dos consumidores por estas 2 formulações de queijo Cottage.

Entre as formulações adicionadas de sais substitutos, a F6 contendo NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 c/probióticos), foi a que mais se destacou, apresentando uma boa preferência, confirmando o teste sensorial de aceitação onde essa formulação não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) das formulações F1, F3 e F4. Essa formulação apresenta um bom potencial para comercialização.

É possível observar que as formulações F2 e F5 se encontram negativamente colocadas em ambas as dimensões, afastadas dos consumidores, demonstrando serem as formulações menos aceitas.

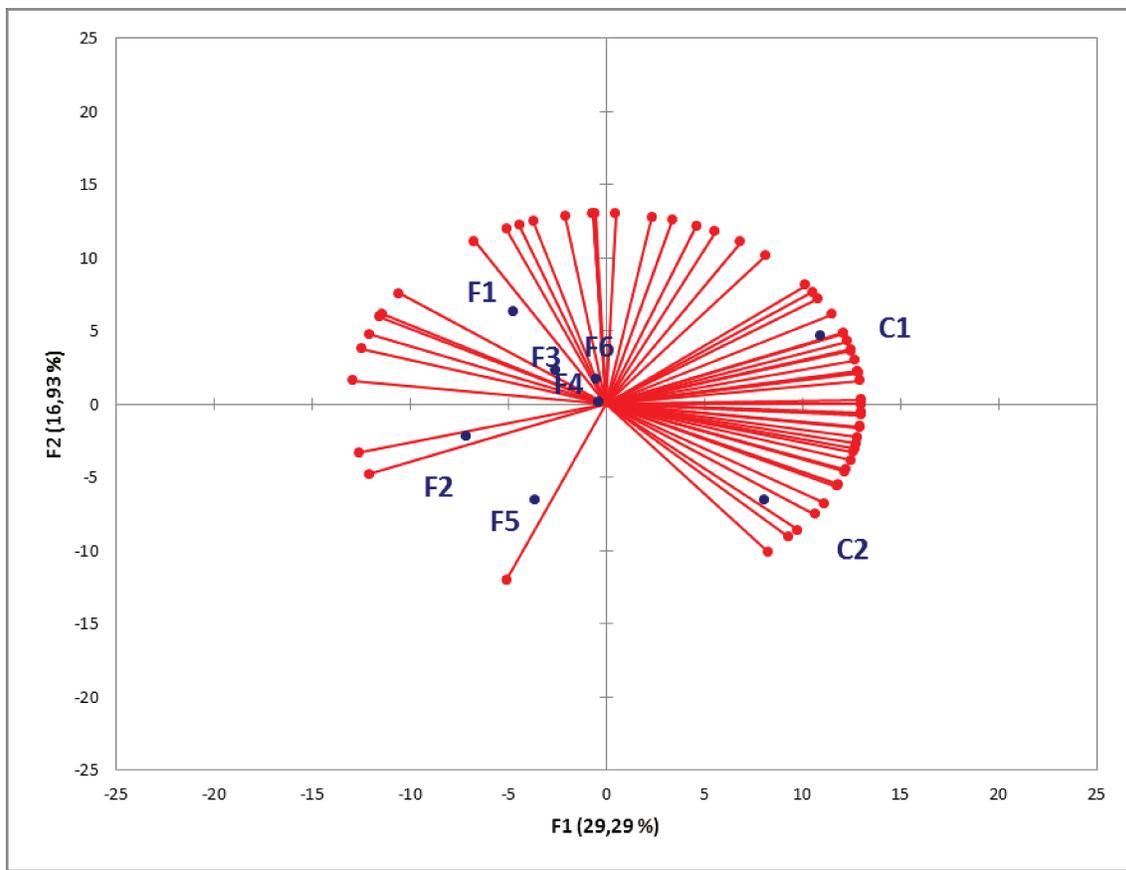


Figura 5. Figura bidimensional da análise do Mapa de Preferência Interno das 8 formulações de queijo Cottage

2.3.5 Escala do ideal (*Just About Right*) e análise de penalidades (*Penalty Analysis*).

Na mesma ficha para análise da aceitação, foi avaliado o ideal de gosto salgado, ácido e textura das formulações, utilizando-se uma escala do ideal de nove pontos (DRAKE, 2007).

As formulações de queijo Cottage foram avaliadas para os atributos de gosto salgado, gosto ácido e textura, e quanto cada um desses se aproxima do ideal para cada um dos consumidores. A escala JAR (*Just About Right*) utilizada foi a seguinte: 1 (extremamente menos que o ideal), 2 (muito menos que o ideal), 3 (moderadamente menos que o ideal), 4 (ligeiramente menos que o ideal), 5 (ideal), 6 (ligeiramente mais que o ideal), 7 (moderadamente mais que o ideal), 8 (muito mais que o ideal) e 9 (extremamente mais que o ideal).

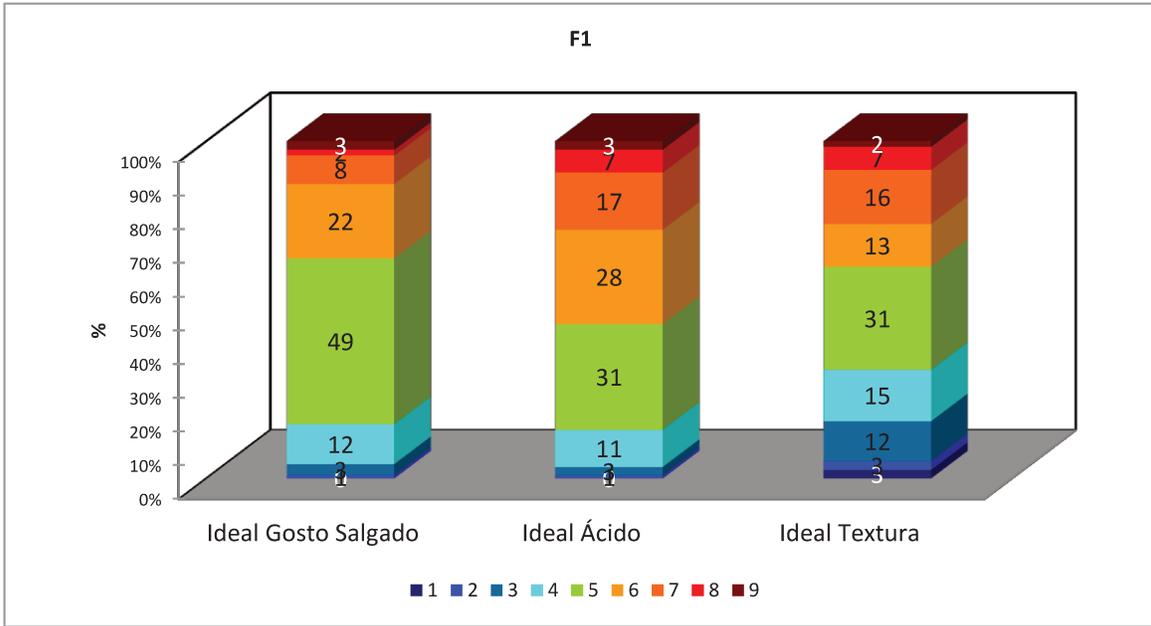


Figura 6: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F1: NaCl 100% sem probióticos.

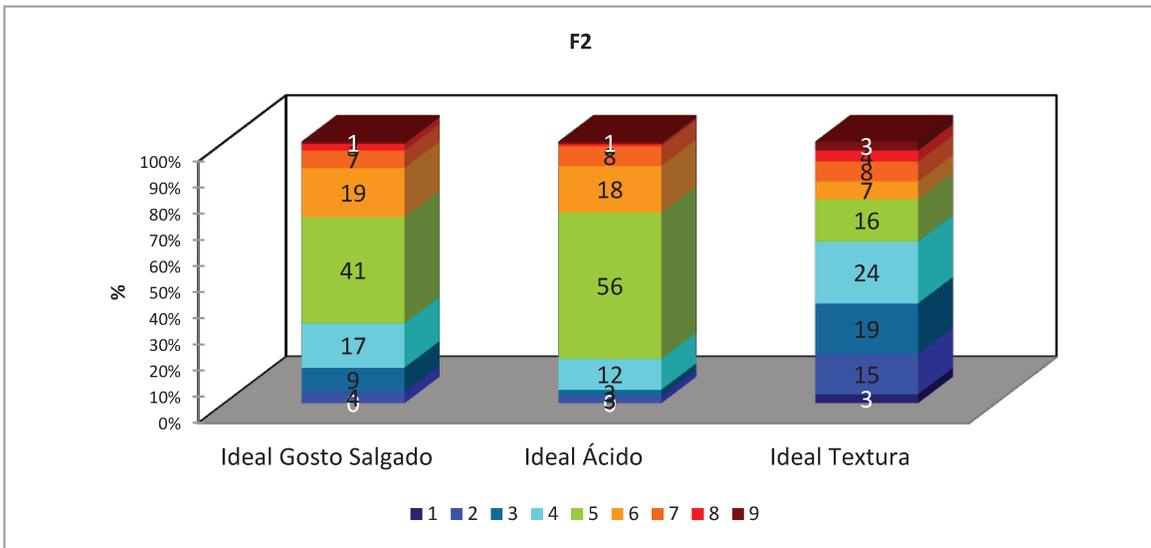


Figura 7: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F2: NaCl 100% com probióticos.

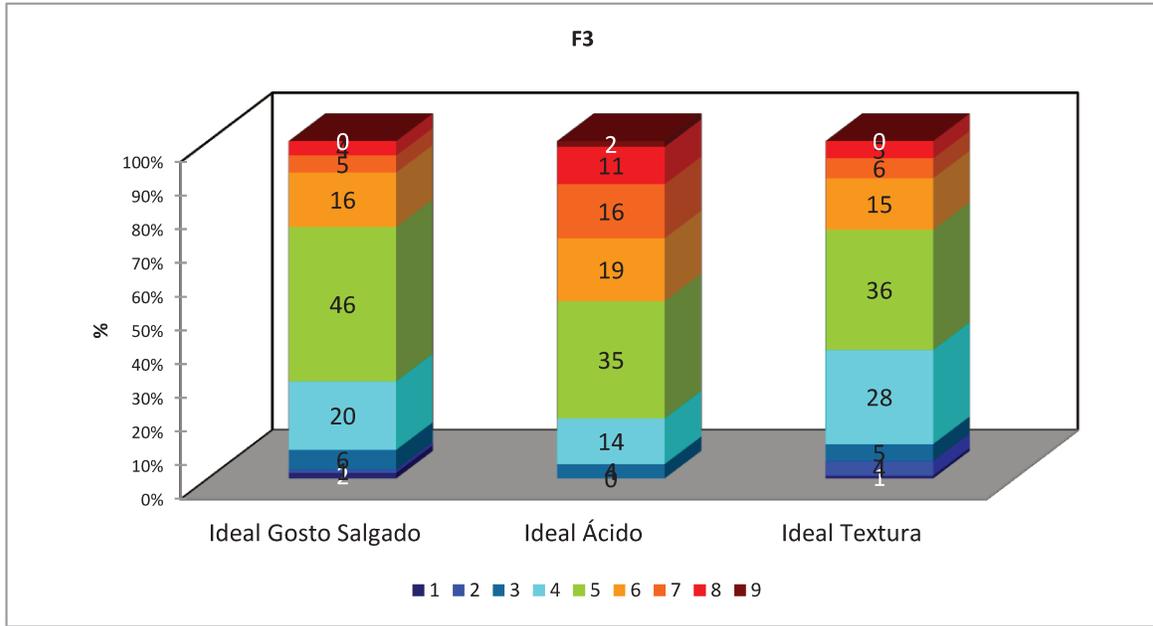


Figura 8: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos).

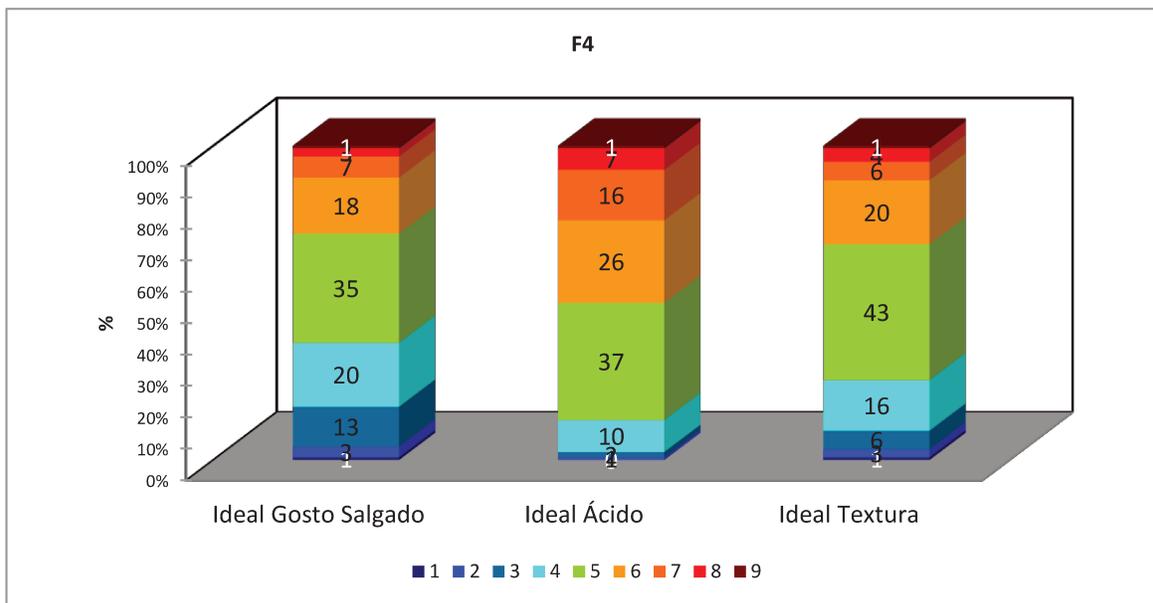


Figura 9: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos).

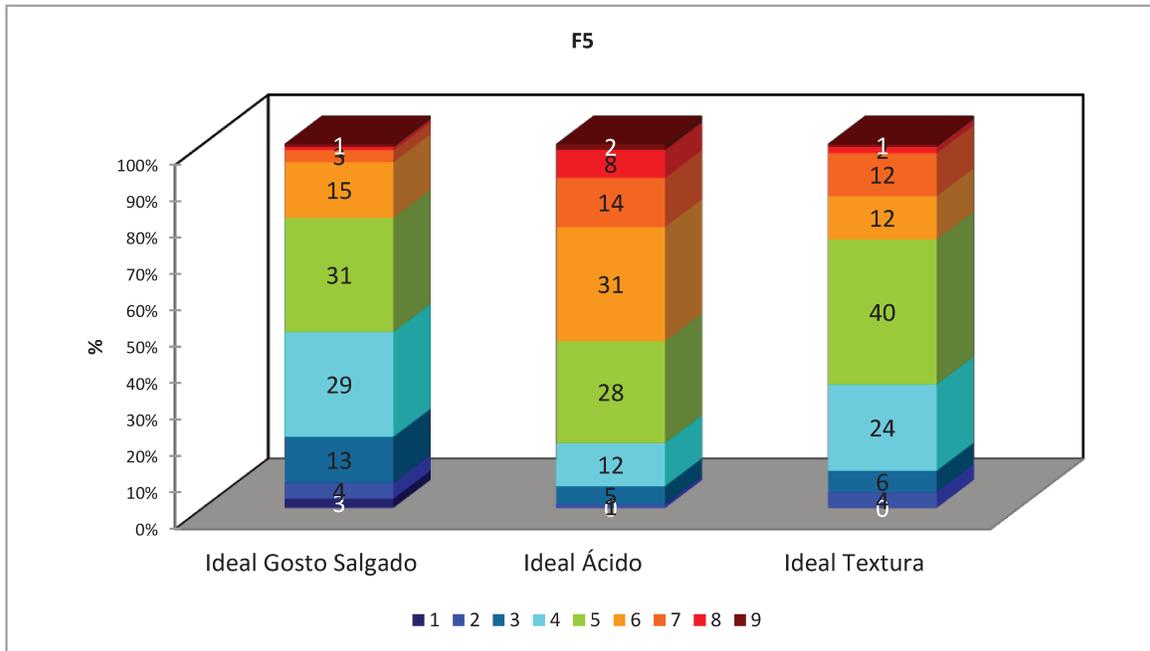


Figura 10: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos).

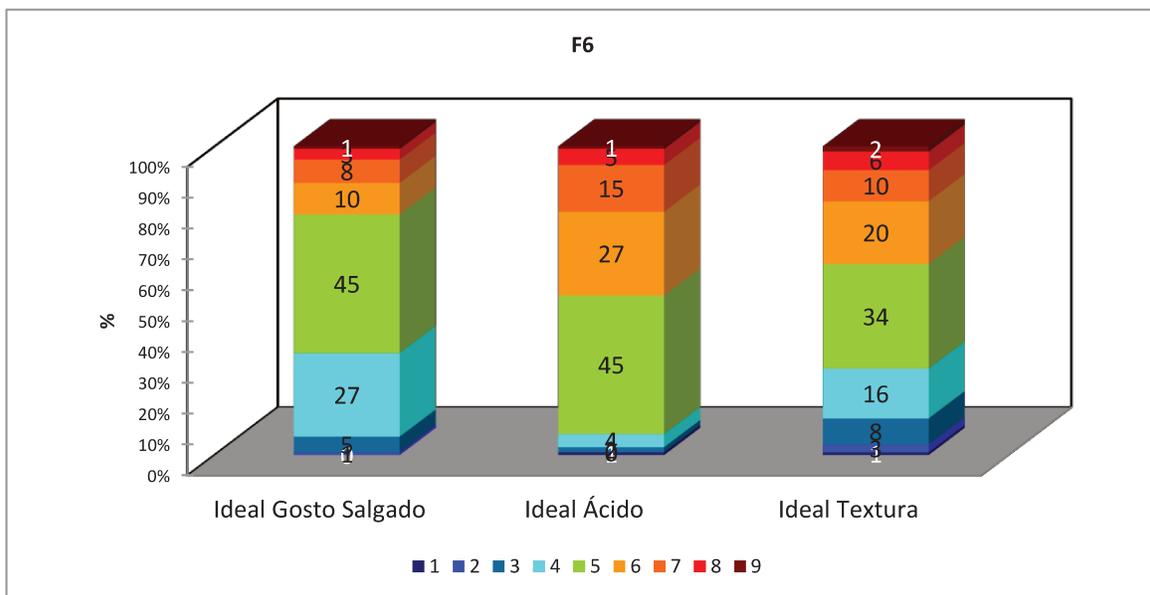


Figura 11: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 c/probióticos).

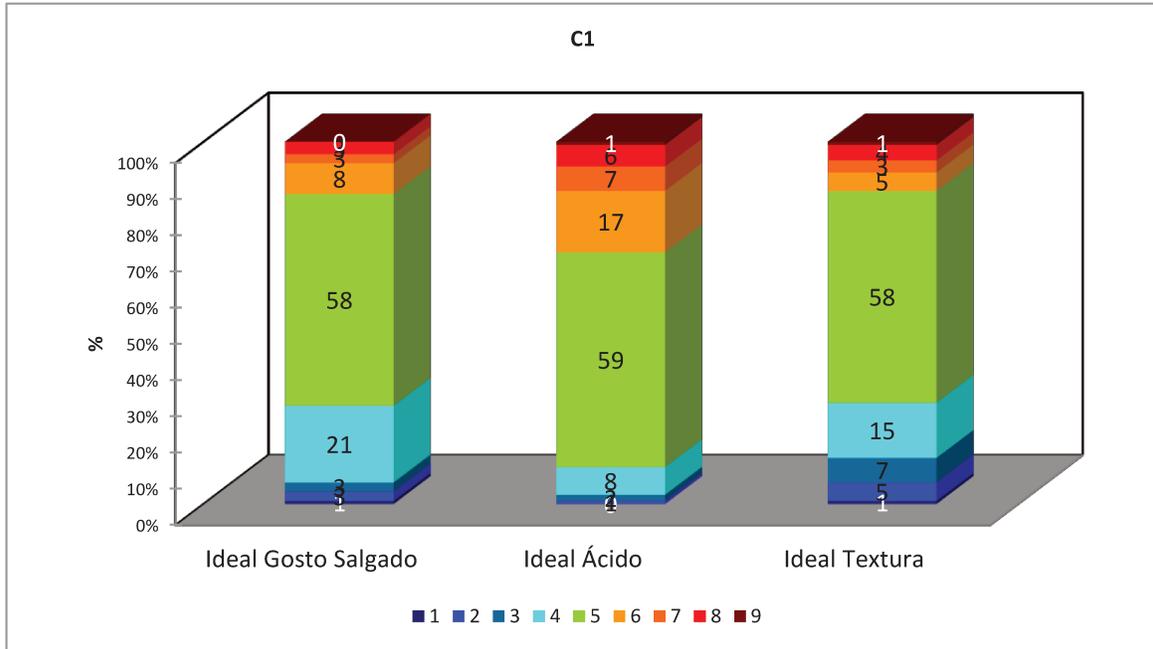


Figura 12: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage C1: queijo Cottage convencional (amostra comercial).

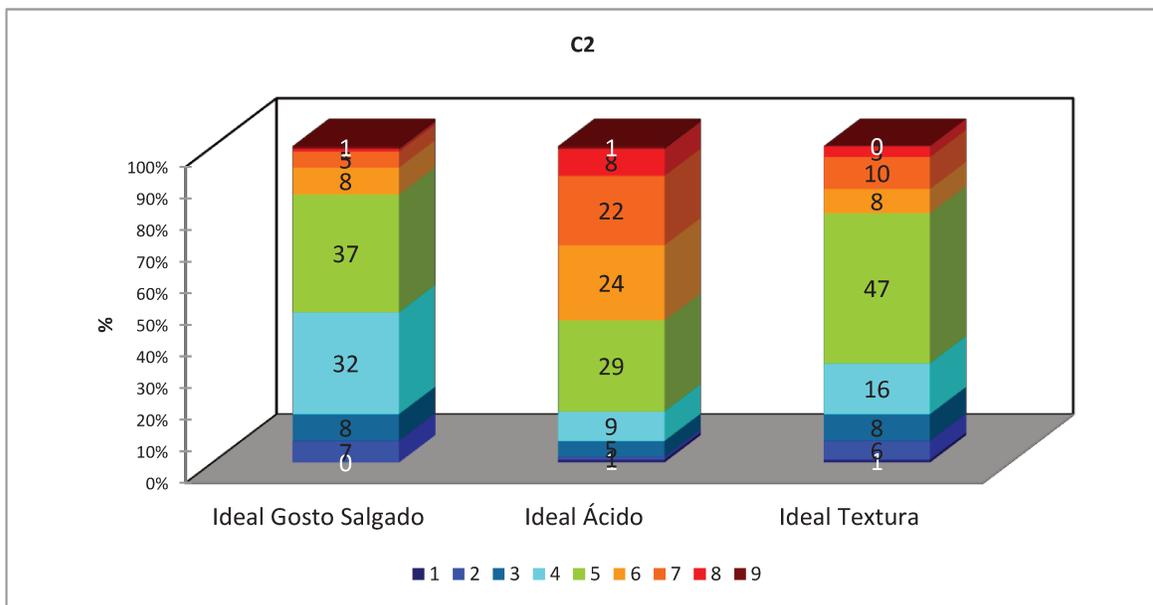


Figura 13: Níveis da escala do ideal para formulação de queijo Cottage C2: queijo Cottage probiótico (amostra comercial).

A formulação F1 (Figura 6) foi avaliada como ideal para os 3 atributos para pelo menos 49% dos consumidores. A formulação F2 (Figura 7) foi avaliada como ideal para gosto ácido para 56% dos consumidores, para 41% dos consumidores o gosto salgado do produto está ideal, e a textura foi avaliada como ideal por apenas 16% dos avaliadores. Quarenta e seis por cento dos consumidores avaliaram o gosto salgado como ideal para a formulação F3 (Figura 8), 35% julgaram como acidez ideal, 36% como textura ideal.

Para a formulação F4 (Figura 9), 43% julgaram a textura como ideal. Para o gosto salgado ideal o julgamento dos consumidores foi de 31% e 45% para as formulações F5 e F6, respectivamente (Figura 10 e 11).

A formulação C1 (Figura 12) foi a que apresentou a maior frequência na região de idealidade para os 3 atributos avaliados, sendo 58%, 59% e 58% para gosto salgado, ácido e textura, respectivamente. Já para a formulação C2 (Figura 13) foi avaliada como ideal para textura para 47% dos consumidores.

Para confirmar a influência das avaliações JAR na aceitação dos produtos e assim identificar potenciais direções para a melhoria dos queijos Cottage elaborados nesse estudo e representados pelas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 foi aplicada a metodologia de *penalty analysis*. Para tal foram utilizados os dados de aceitação global que expressam a satisfação global do consumidor em relação a um produto e aqueles obtidos pela escala JAR, que indicam o quão ideal um produto está em relação ao esperado pelo provador. Nas Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 estão apresentados os resultados obtidos a partir da análise dos dados sensoriais das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6, C1 e C2 pela metodologia de *penalty analysis*.

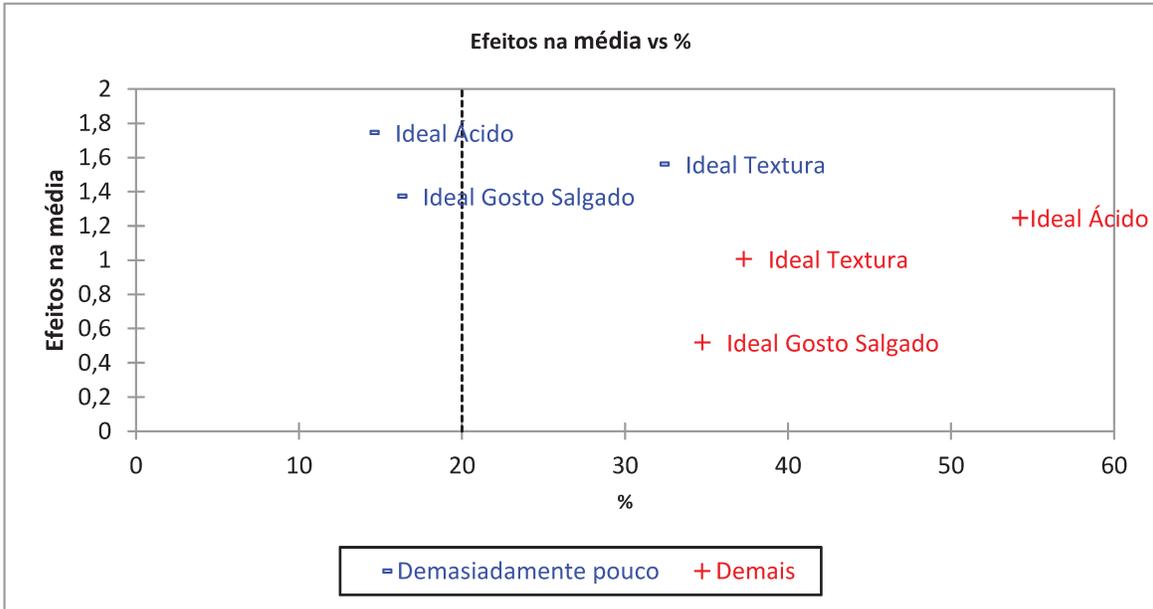


Figura 14. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F1 (100% de NaCl sem probióticos).

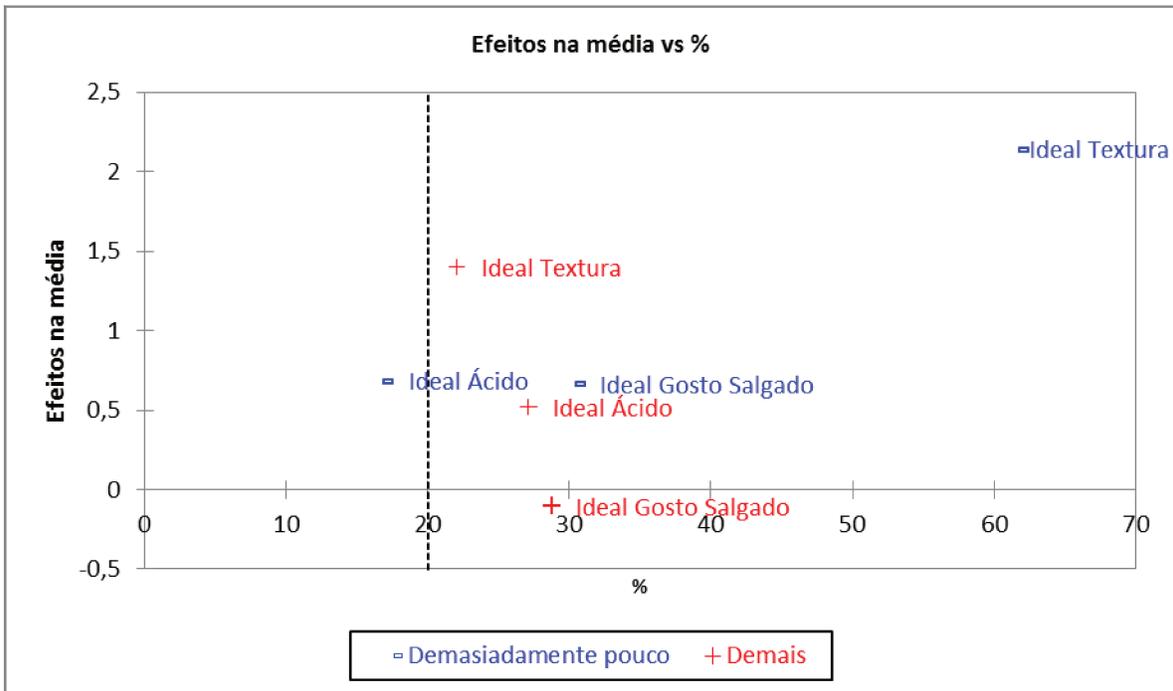


Figura 15. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F2 (100% de NaCl com probióticos).

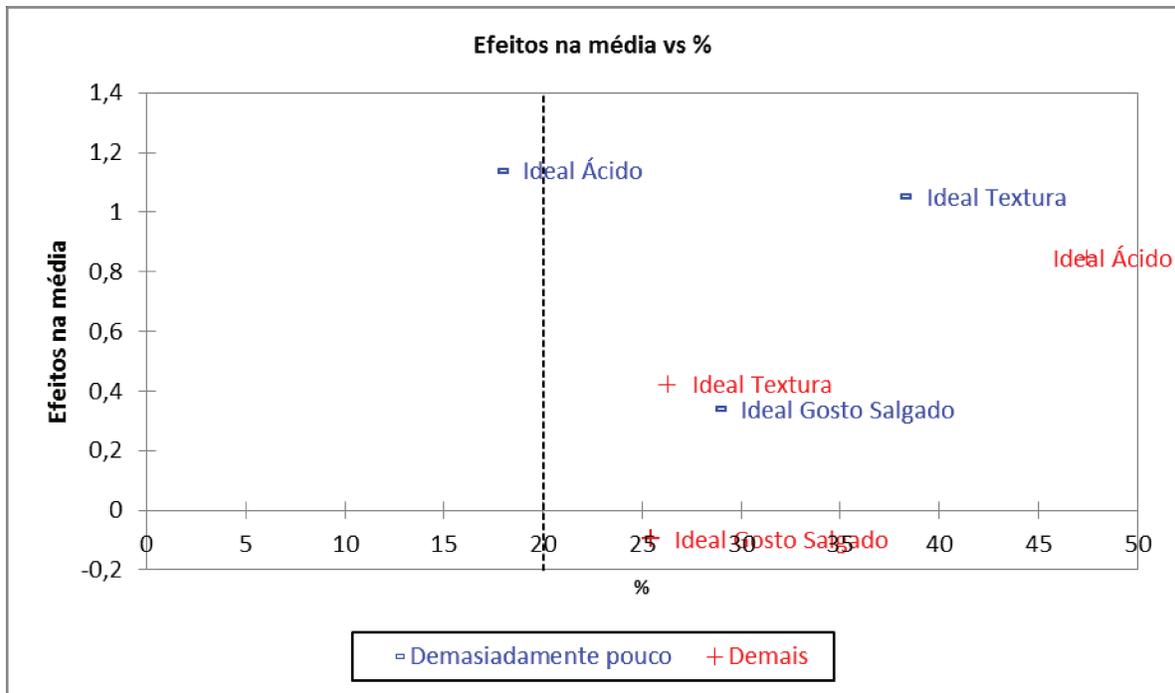


Figura 16. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos).

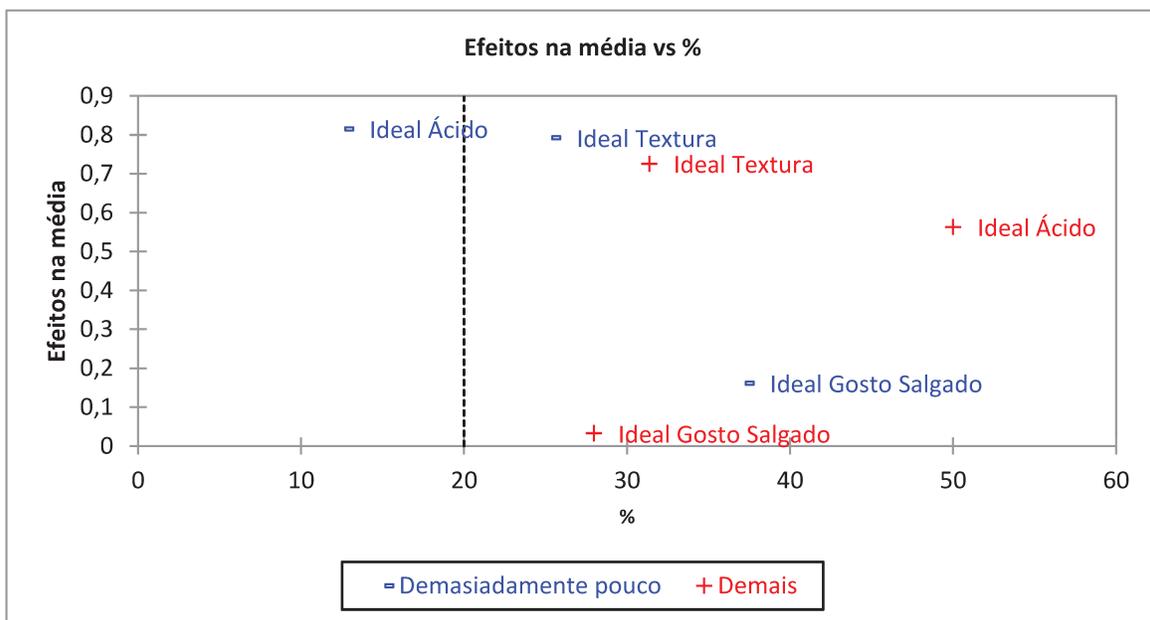


Figura 17. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos).

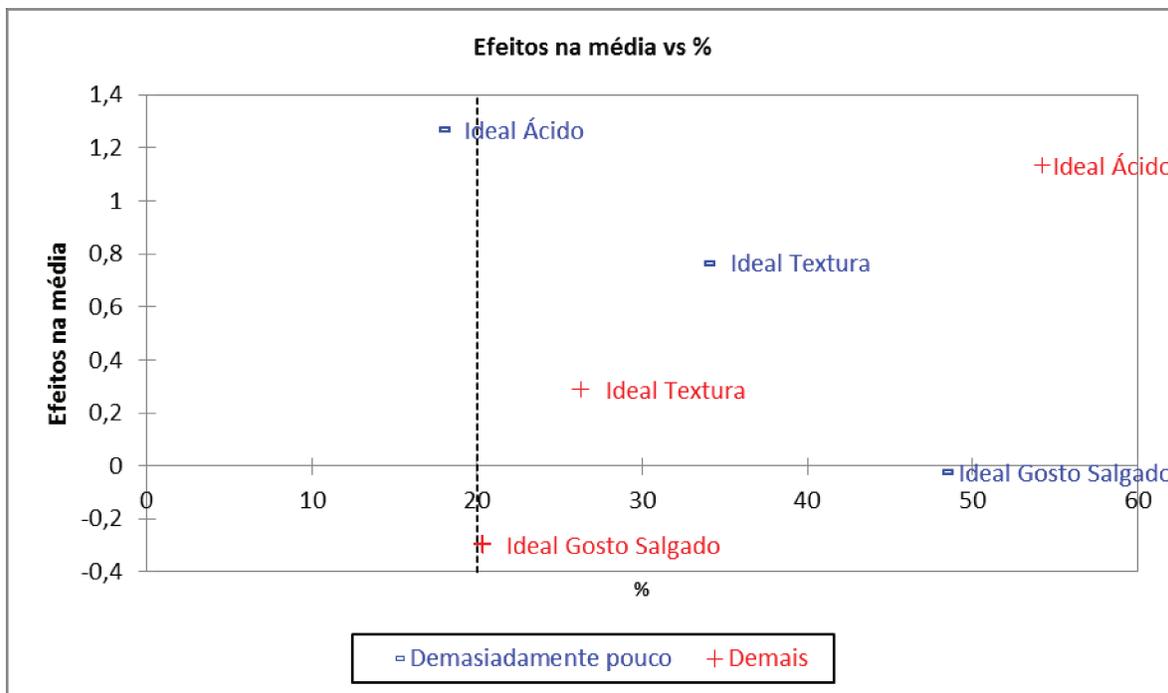


Figura 18. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos).

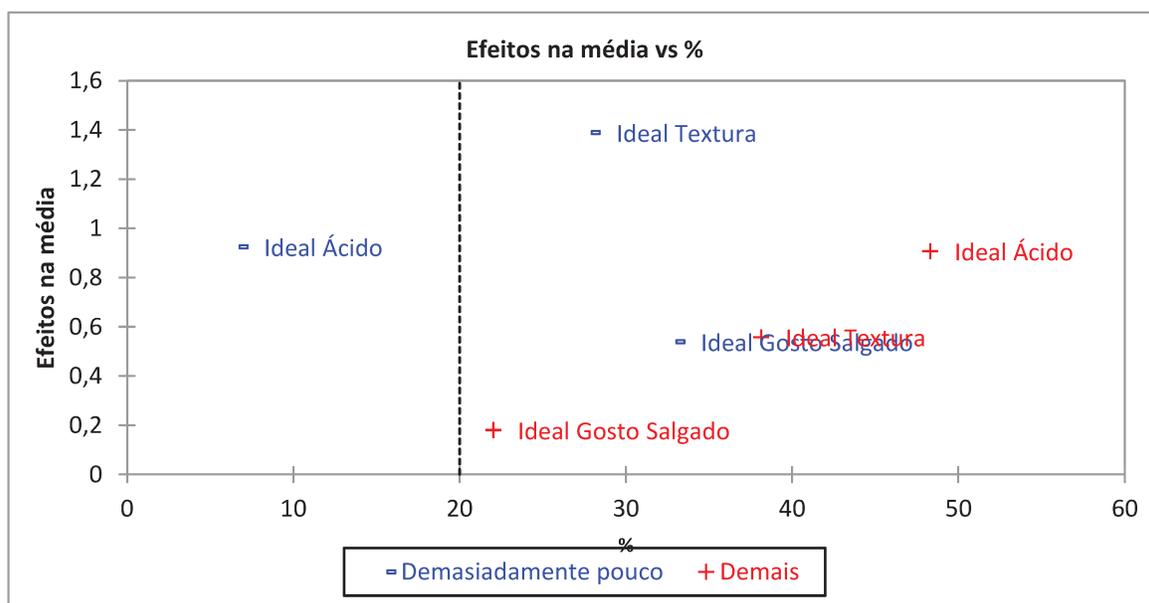


Figura 19. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 c/probióticos).

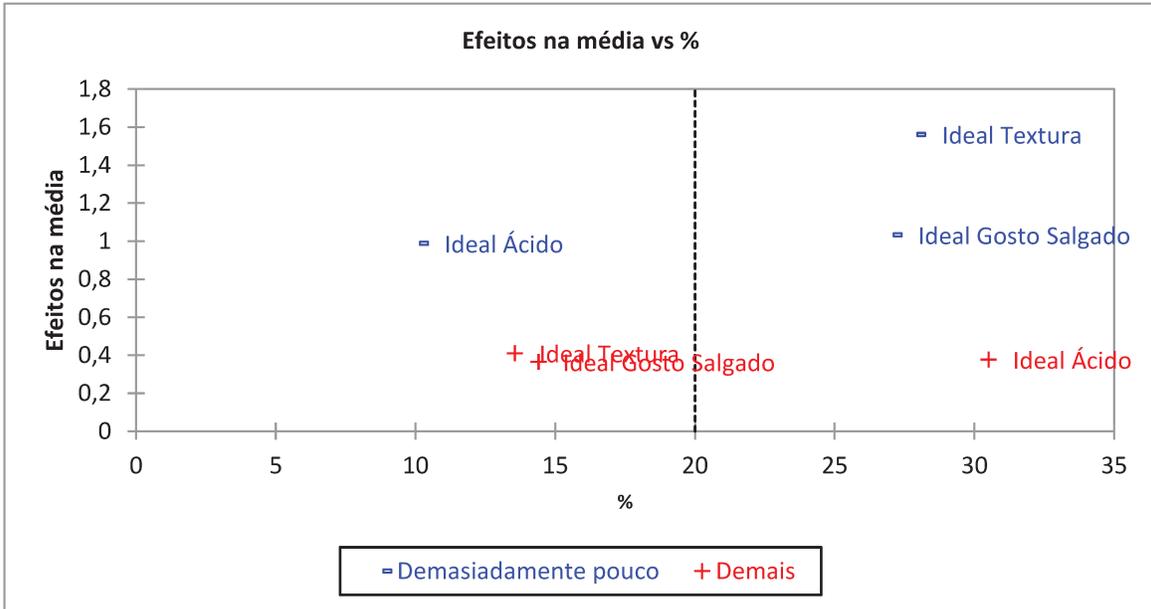


Figura 20. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação C1: queijo Cottage convencional (amostra comercial).

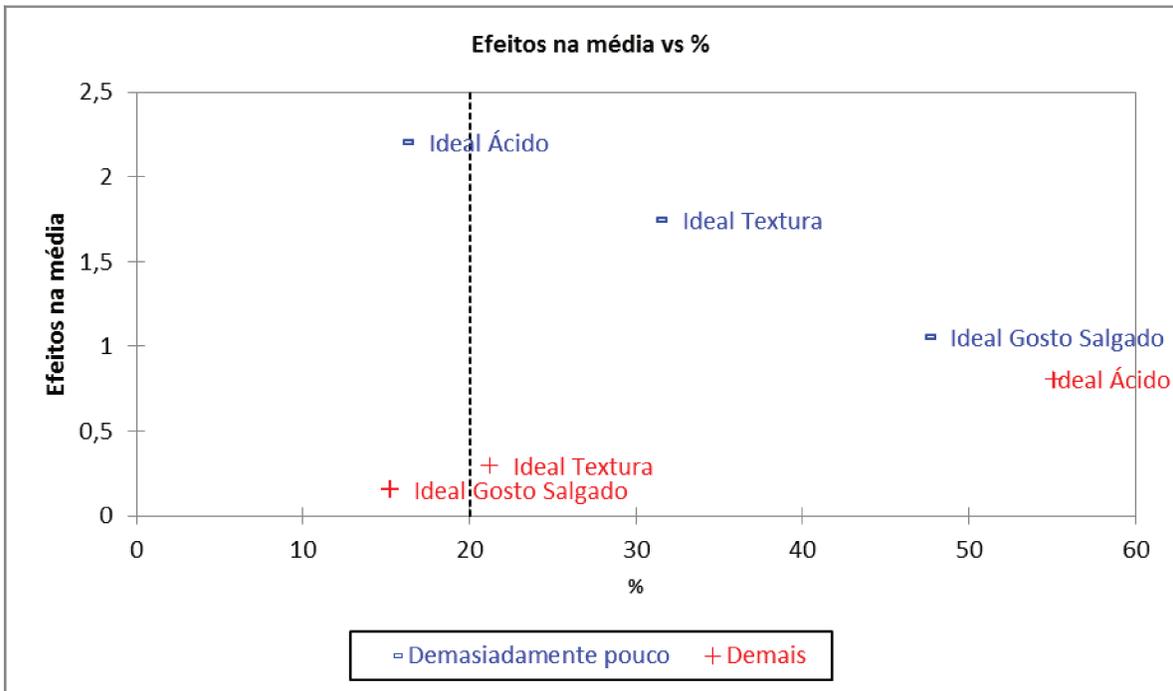


Figura 21. Influência dos atributos gosto salgado, gosto ácido e textura na aceitação global da formulação C2: queijo Cottage probiótico (amostra comercial).

Tabela 6. Notas médias obtidas no teste de aceitação, para avaliar os atributos aceitação global (escala hedônica), gosto salgado, gosto ácido e textura (escala JAR) das formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6, C1 e C2.

Formulação	Gosto Salgado	Gosto ácido	Textura	Impressão Global
F1	5.33	5.73	5.15	6.28 ^{b,c}
F2	4.94	5.14	4.26	5.57 ^d
F3	4.97	5.68	4.88	6.29 ^{b,c}
F4	4.83	5.66	5.09	6.29 ^{b,c}
F5	4.50	5.63	4.95	5.85 ^{d,c}
F6	4.99	5.65	5.21	6.42 ^{a,b}
C1	4.86	5.38	4.80	6.85 ^a
C2	4.55	5.71	4.83	6.40 ^{a,b}

Médias com letras em comum na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as formulações ($p \leq 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

Avaliando a Figura 14, observa-se que, dentre os atributos avaliados, aquele que contribuiu significativamente para a penalização da aceitação global do queijo Cottage elaborado pela formulação F1 foi a textura. O resultado obtido evidencia que 32,2% dos provadores penalizaram a aceitação global do queijo Cottage elaborado pela formulação F1, em 1,5 pontos, por acharem que este apresentava textura “um pouco menos do que gostariam” (nota média 5.15) (Tabela 6). Comparando este resultado com aqueles obtidos pela escala hedônica e histograma de frequência de respostas, embora o queijo Cottage elaborado por esta formulação tenha sido bem aceito (média 6.28) e considerado como textura ideal para 31% dos provadores, a resposta fornecida pela *penalty analysis* indica que a aceitação de tal produto pode ser aumentada se os parâmetros relacionados à textura forem reavaliados.

A formulação F2 (Figura 15) foi considerada por 61,8% dos consumidores como menos dura que o ideal e assim obteve um efeito (penalidade) de 2,1 sobre

a média. Para a aceitação do produto, este resultado representa um risco potencial, pois as características que apresentam uma alta penalização são aquelas que são mencionadas por um grande número de pessoas.

Para essa metodologia a penalização geralmente não é computada se a porcentagem dos consumidores nas categorias “demasiadamente pouco” ou “demais” é inferior a 20 %. É o caso das formulações F3, F4, F5, F6, C1 e C2, onde o gosto ácido “demasiadamente pouco” se encontra abaixo do limiar de 20%.

Analisando a Figura 18, observa-se que a intensidade de gosto ácido apresentada pelo queijo Cottage probiótico da formulação F5 influenciou na sua aceitação global. Os resultados mostram que aproximadamente 54,2% dos consumidores penalizaram a aceitação global do produto (nota média 5.85), em 1,1 pontos, por acharem que esta formulação apresentava um gosto ácido “mais ácido do que gostariam” (nota média 5.63) (Tabela 6). Provavelmente a acidez dos queijos foi provocada pela produção de ácidos orgânicos resultante do metabolismo das culturas empregas.

Pelo histograma de frequência de respostas, para o atributo gosto ácido, aproximadamente 54% dos consumidores responderam que F5 estava com gosto ácido “muito mais intenso do que gostariam”. Tal resultado evidencia a necessidade da reavaliação dos parâmetros que interferem na acidez do produto, a fim de elevar a aceitação do queijo Cottage probiótico para essa formulação.

Para a formulação F6 tanto para “demasiadamente pouco” quanto para “demais”, com relação ao gosto salgado ideal, os efeitos (penalidades) sobre a média não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), o que ocorreu também com relação ao ideal de gosto salgado para as formulações F1, F2, F3, F4 e F5. Somente para as formulações C1 e C2, o ideal de gosto salgado para “demasiadamente pouco” foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

É importante salientar que atributos não são independentes, alterações em um atributo são acompanhadas por alterações nos outros atributos também. A análise de penalidades fornece uma lista priorizada de características críticas do produto que são mais penalizadoras para o desempenho do produto (SOCIETY OF SENSORY PROFESSIONALS, 2013).

2.3.6 Avaliação da viabilidade das culturas *starter* e das culturas probióticas

Os queijos Cottage com e sem adição de probióticos e com diferentes sais hipossódicos foram produzidos no mesmo dia, utilizando-se o mesmo inóculo, para permitir a avaliação do efeito desses ingredientes no crescimento e viabilidade das culturas. As contagens das culturas foram feitas no 1º dia de produção dos queijos, no dia 14º e no 28º dia (final da vida de prateleira) e encontram-se nas Figuras 22, 23 e 24.

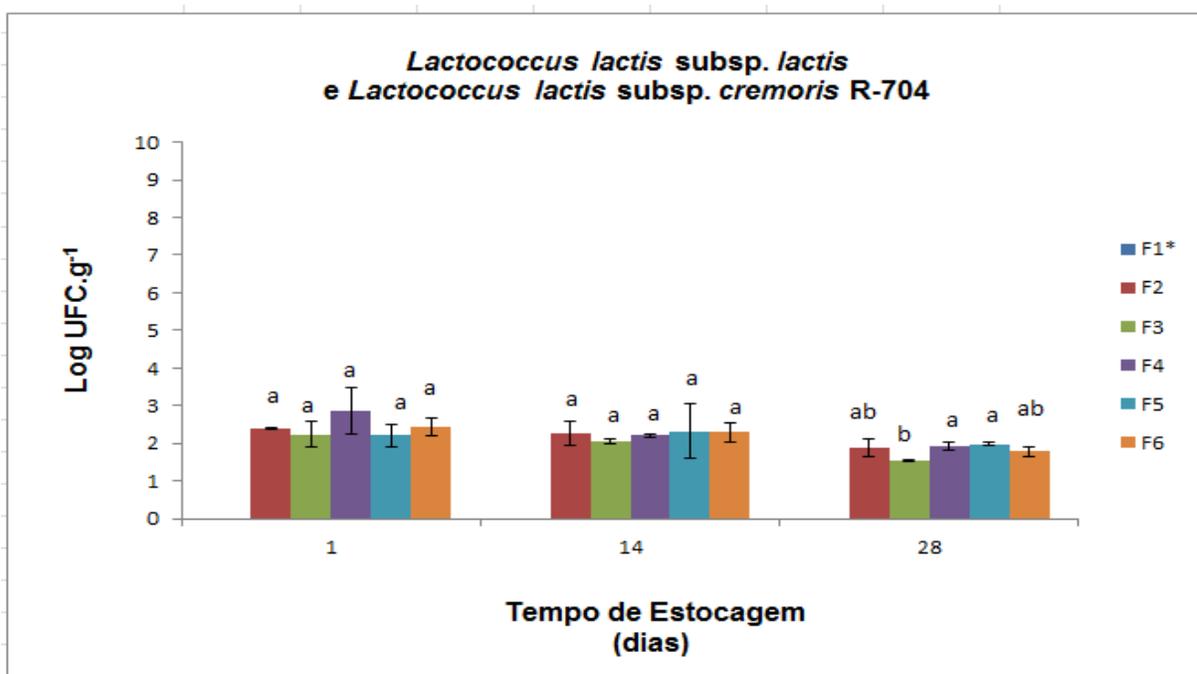


Figura 22. Viabilidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 em queijo Cottage probiótico durante estocagem refrigerada ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

*F1: contagens nos 3 dias de estocagem : $<10 \text{ Log UFC.g}^{-1}$. Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

Letras minúsculas iguais entre as formulações no mesmo dia não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

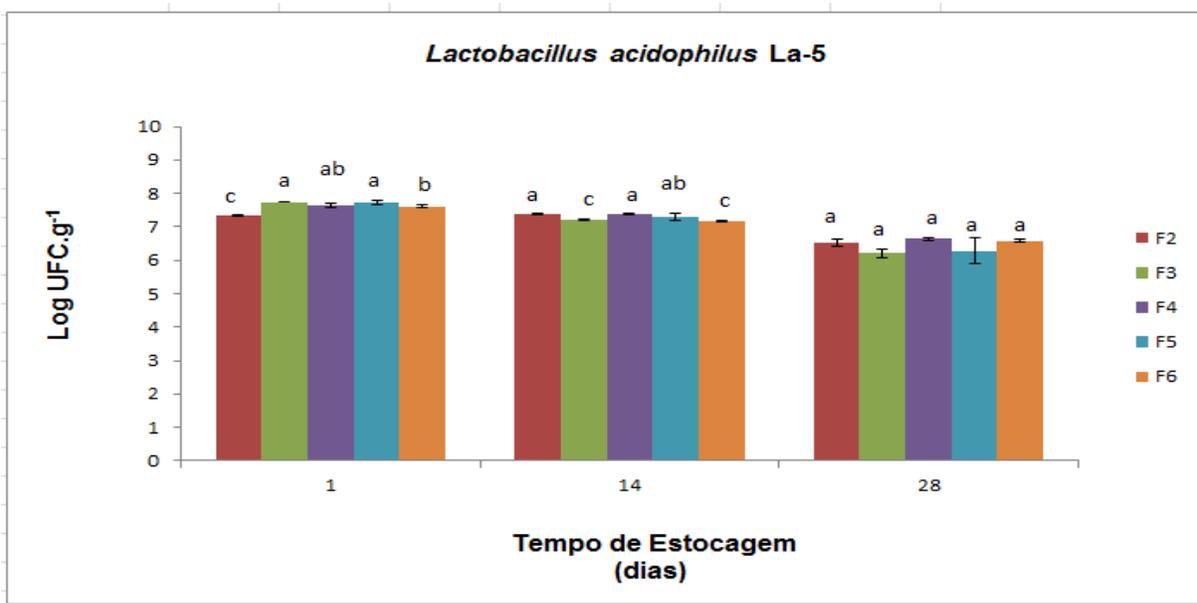


Figura 23. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 em queijo Cottage probiótico durante estocagem refrigerada ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Formulações: F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

Letras minúsculas iguais entre as formulações no mesmo dia não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

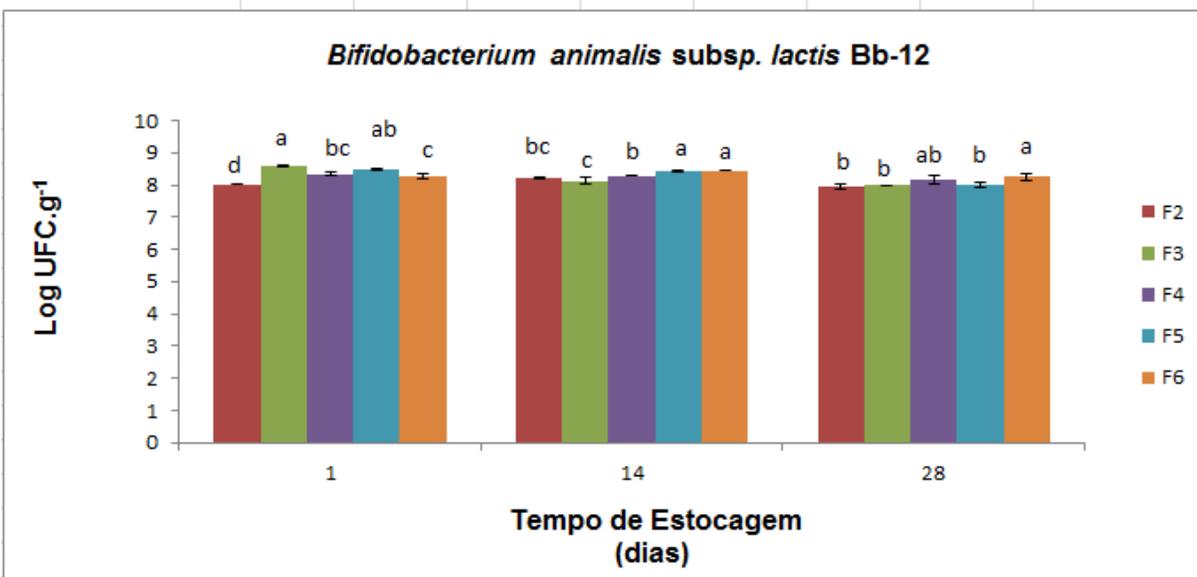


Figura 24. Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em queijo Cottage probiótico durante estocagem refrigerada ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Formulações: F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

Letras minúsculas iguais entre as formulações no mesmo dia não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

A literatura científica estabelece que a quantidade de culturas probióticas no alimento processado deve ficar em torno de 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ no produto final (SHAH, 2000), alcançando até 10^8 - 10^9 UFC proveniente do consumo diário de 100 g ou 100 ml do alimento, beneficiando conseqüentemente a saúde do consumidor (JAYAMANNE e ADAMS, 2006). No Brasil, a legislação em vigor determina que a quantidade viável mínima de culturas probióticas deve ser entre 10^8 e 10^9 UFC por porção de produto e que a contagem deve constar no rótulo do produto (ANVISA, 2008). Dessa forma, a viabilidade da cultura durante o armazenamento deve ser verificada (DAMIN et al., 2008).

Na formulação F1 elaborada apenas com NaCl e sem adição de probióticos a contagem da cultura starter de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 (Figura 22) permaneceu em torno de <10 log UFC.g⁻¹ em todos os dias de estocagem. E também nas formulações com culturas probióticas a população da cultura starter não apresentou boa viabilidade, apresentando valores abaixo de 3,0 log UFC.g⁻¹ para todas as formulações. Uma possível explicação para esse fato seria o próprio processamento do queijo Cottage, onde o queijo passa por um processo de três lavagens consecutivas da massa, o que poderia ter diminuído a quantidade da cultura starter. Isso também explica o fato de a quantidade de probióticos adicionadas ao queijo Cottage serem introduzidas no final do processamento, ou seja, juntamente com o *dressing*.

As contagens das culturas probióticas estão demonstradas nas Figuras 23 e 24, confirmando que os tratamentos se enquadram dentro dos padrões estipulados pela legislação brasileira, podendo ser designados como queijo probiótico, pois em todas as formulações, ao final do período de estocagem de 28 dias, as contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ficaram acima de 8 log UFC.g⁻¹, e a de *Lactobacillus acidophilus* La-5 acima de 6,2 log UFC.g⁻¹. Considerando que uma porção para queijo Cottage possui cerca de 50 g, e o recomendado pela legislação para leites e derivados são 2 porções diárias (BRASIL, 2003).

A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 podem ser observadas através das Figuras 23 e 24. A

população de *Lactobacillus acidophilus* La-5 se manteve quase inalterada entre os dias 1 e 14 para todas as formulações, apresentando valores superiores a 7,0 log UFC g⁻¹. Já no final do período de estocagem as contagens de *Lactobacillus acidophilus* La-5 diminuíram um ciclo logarítmico, atingindo valores entre 6,2 e 6,6 log UFC.g⁻¹ não havendo diferença estatística (p>0,05) entre as formulações.

As contagens para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 foram as que apresentaram melhores resultados. Enquanto para as culturas de *L. acidophilus* La-5 a contagens finais ficaram em torno de 6,2 e 6,5 log UFC.g⁻¹, existindo uma perda de viabilidade conforme o tempo de armazenamento, a cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 apresentou as melhores contagens para todas as formulações estudadas, alcançando valores acima de 8,0 log UFC g⁻¹. As formulações F6 e F4 foram as que apresentaram as melhores contagens, 8,2 e 8,1 log UFC g⁻¹ não diferindo estatisticamente (p>0,05) uma da outra ao final do período de estocagem.

Em um estudo realizado por Pereira e colaboradores (2010) os autores verificaram que para queijo *petit suisse* probiótico inoculado com *S. thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, as populações de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* observadas no presente trabalho, foram sempre superiores às populações de *Lactobacillus acidophilus*. Tais resultados não eram esperados, uma vez que as bifidobactérias são descritas como mais sensíveis a variações de pH e menos tolerantes a temperaturas de refrigeração (LOURENS-HATTING & VILJOEN, 2001).

Uma excelente alternativa para aumentar a multiplicação de um probiótico é a adição de outra espécie probiótica em co-cultura. Entretanto, deve-se verificar a compatibilidade entre as culturas a serem empregadas. Gomes e Malcata (1999) demonstraram que *Bifidobacterium lactis* multiplicaram-se mais em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*. O estímulo da multiplicação de *Bifidobacterium bifidum* por *Lactobacillus acidophilus* também foi descrito por Svensson (1999). A viabilidade do gênero *Bifidobacterium* spp. parece ser aumentada quando em presença de outra bactéria probiótica, gerando valores elevados para todas as bactérias avaliadas (VINDEROLA et al., 2000; CORRÊA et al., 2008), o que pode

ter ocasionado valores similares neste estudo. Igualmente, a adição de *Lactococcus lactis* no leite, visando o decréscimo do potencial de oxirredução (JEASON et al, 2009) também tem apresentado impacto positivo, com a vantagem de que esse micro-organismo pode ainda favorecer o crescimento de Bifidobacterias (YONEZAWA et al, 2010).

Assim como em outros trabalhos, queijos frescos apresentam viabilidade probiótica satisfatória (VINDEROLA et al., 2000; BURITI et al., 2005; SOUZA E SAAD, 2009, PEREIRA et al., 2010), porém, poucos estudos analisaram a influência do uso de sais hipossódicos sobre o crescimento de bactérias probióticas em queijos.

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que os queijos Cottage probióticos elaborados, adicionados de diferentes sais hipossódicos, possuem melhor viabilidade para o micro-organismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 durante todo o período próprio para consumo, estabelecido em 28 dias. Além disso, não se observou influência negativa da redução de sódio sobre as culturas probióticas, nas concentrações utilizadas nesse estudo, apresentando melhores resultados nas formulações F6, onde houve redução de sódio de 25% de NaCl e substituição por KCl (12,5%) e MgCl₂ (12,5%), e na formulação F4 (50% NaCl e 50%KCl). Ambas as formulações não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) uma da outra. Comparando a formulação F6 com a formulação F2 (100% NaCl com probióticos), a F6 apresentou uma contagem ligeiramente maior que a F2, diferindo estatisticamente ($p<0,05$).

2.4 Conclusões

O queijo Cottage probiótico demonstrou ser uma excelente matriz para adição de sais hipossódicos, pois o poder de salga dos sais hipossódicos não é alterado em relação ao NaCl, sendo uma excelente alternativa para dietas com restrição de sódio.

A metodologia de estimativa de magnitude se mostrou como uma excelente alternativa para substituição parcial de NaCl por sais hipossódicos em queijo Cottage probiótico.

Um atributo sensorial que influencia a penalização das formulações de queijo Cottage é a textura, sendo que esse atributo deve ser levado em consideração para direcionar a melhoria na aceitação do queijo Cottage probiótico.

Todas as formulações de queijo Cottage apresentaram potencial probiótico desde que consumidas numa porção adequada de 100 g de queijo, uma vez que a concentração dos probióticos mativeram-se dentro dos padrões estipulados pela legislação brasileira.

A redução na quantidade de sal em até 25% nos queijos mantém uma boa aceitação pelo consumidor, sendo a formulação mais aceita aquela com redução de sódio de 25% de NaCl e substituição por KCl (12,5%) e MgCl₂ (12,5%), o que está relacionado ao baixo teor de gordura e alto teor de umidade desse tipo de queijo. Esse resultado é de grande relevância para a indústria de produtos lácteos.

2.5 Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, T. L. D.; LIMA, M. D. A.; OLIVEIRA, V.S.; COELHO, R.M.D.A.; RODRIGUES, M.D.C.P. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 191-198, jul./dez. 2009.

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

AMERINE, M. A; PANGBORN, R. M; ROESSLER, E. B. **Principles of Sensory Evaluation of Food**. New York: Academic Press, 1965.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho, 2008. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 19 de dezembro de 2013.

ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S.; FURTADO, M.M.,MORAES, C.A. Produção de queijo Cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas em diferentes níveis de estresse. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, p. 111-118, 2009.

ARMENTEROS M, ARISTOY MC, BARAT JM & TOLDRÁ F. Biochemical and sensory changes in dry-cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. **Meat Science**, v. 90, p. 361–367, 2012.

BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M. A.; REGO, R. A. As tendências da alimentação. In: **Brazil Food Trends 2020**, cap.3, p.39-47, São Paulo, 2010.

BARBOZA, L. M. V.; FREITAS, R. J. S. D.; WASZCZYNSKYJ. **Brasil Alimentos**, nº 18 – Janeiro/Fevereiro de 2003, disponível em:
<http://www.signuseditora.com.br/ba/pdf/18/18%20-%20Desenvolvimento.pdf>, Acesso em: 09 de dezembro de 2013.

BERGAMINI, C.V., HYNES, E.R., PALMA, S.B., SABBAG, N.G., ZALAZAR, C.A. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Dairy Journal**, v.19, p. 467-475, 2009.

BOWER, J. A; e BOYD, R. Effect Of Health Concern And Consumption Patterns On Measures Of Sweetness By Hedonic And Just-About-Right Scales. **Journal of Sensory Studies**, v. 18, p. 235–248, 2003.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União** em 26 de dezembro de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/359_03rdc.pdf.

BRASIL, 1995. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria Nº 54/MS/SNVS, de 4 de julho de 1995**. Aprova o Padrão de identidade a Qualidade para Sal Hipossódico, 1995.

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, 2005.

CADENA, R. S; BOLINI, H. M. A. Time–Intensity Analysis And Acceptance Test For Traditional And Light Vanilla Ice Cream. **Food Research International**, v. 44, p. 677–683, 2011.

CARDOSO, J.M.P. and BOLINI, H.M.A. Different Sweeteners In Peach Nectar: Ideal And Equivalent Sweetness. **Food Research International**, v. 40, p. 1249–1253, 2007.

CERVANTES B.G.; AOKI N.A.; ALMEIDA C.P.M.; **Brazilian Journal of Food Technology**, 6º SENSIBER, p. 3-10, 19-21 de agosto de 2010.

CHRISTIAN HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutritive cultures. 5p. [**Analytical Proceedment**], 1999.

CORRÊA, S.B.M., CASTRO, I.A. e SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **Int. Journal of Food Science Technology**, v. 43, p. 1560–1568, 2008.

COSTELL, E; PASTOR, M. V; IZQUIERDO, L; DURAN, L. Relationships Between Acceptability And Sensory Attributes Of Peach Nectars Using Internal Preference Mapping. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 199-204, 2000.

CRUZ, A. G., F. C. A. BURITI, C. B. H. SOUZA, J. A. F. FARIA, AND S. M. I. SAAD. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.344–354, 2009.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; POLLONIO, M. A. R.; BOLINI, H. M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; GRANATO, D.; SHAH, N. P. Cheeses with reduced sodium

content: effects on functionality, public health benefits and sensory properties. **Trends in Food Science and Technology**, v.22, p. 276-291, 2011.

DAMIN, M.R., E. MINOWA, M.R. ALCANTARA AND M.N. OLIVEIRA.. Effect of cold storage in viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p.40-55, 2008.

DeSIMONE JA, LYALL V. Taste receptors in the gastrointestinal tract III. Salty and sour taste: sensing of sodium and protons by the tongue. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, p. G1005–G1010, 2006.

DEWITT, M. C. A. Processing and ingredients: Sodium reduction. Pages 1–5 in **Reciprocal Meat Conference**, Proc. Am. Meat Sci. Assoc., Gainesville, FL. Am. Meat Sci. Assoc., Champaign, IL.,2008.

DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4925–4937, 2007.

DRAKE, S. AND M. DRAKE. Application of sensory methods to development of probiotic and prebiotic foods. Pages 113–130 in **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health**. N. P. Shah, A. G. Cruz, and J. A. F. Faria, ed. Nova Publisher, New York, NY. 2011.

DURACK, E., M. A. GONZALEZ, AND M. G. WILKINSON. Salt: A review of its role in food science and public health. **Curr. Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p.290–297, 2008. *Federation Standard*. 5 p,1997.

FARKE, N.Y. “Cheese technology”. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.91-98, 2004.

FORMAKER BK &HILL DL. An analysis of residual NaCl taste response after amiloride. **American Physiological Society**, v. 255, p.1002–1007, 1988.

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, p.621-627, 2010.

GOMES, A. P., CRUZ, A. G., CADENA, R. S., CELEGHINI, R. M. S., FARIA, A. F., BOLONI, H. M. A., POLLONIO, M. A. R., GRANATO, D. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2701-2706, 2011.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties

relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRUMMER J, KARALUS M, ZHANG K, VICKERS Z & SCHOENFUSS T.C. Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 2830–3839, 2012.

HEALTH CANADA, 2010. **Sodium reduction strategy for Canada**. Disponível em: http://www.hcsc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/nutrition/sodium/strateg/reduct-strat-eng.pdf. Acesso em: 16 de fevereiro de 2014.

IDF. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. **International Dairy Federation Standard**. 5 p, 1997.

IDF. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bulletin of the **International Dairy Federation**, v. 306, p. 23-33, 1999.

JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1131-1138, 2009.

JEASON, S.; HILGERT, M-O.; COQUILLARD, C.; SEUKPANYA, C.; FAIVELEY, M.; NEVEU, P.; ABRAHAM, C.; GEORGESCU, V.; FOURCASSIÉ, P.; BEUVIER, E. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p.75-81, 2009.

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

KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. & ROUSSIS, I.G. Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. **Food Chemistry**, v. 61, n.1/2, p. 63-70, 1998.

KUWABARA, A. Nutrition and bone health. Dietary sodium intake and bone health. **Clinical Calcium Journal**, v.20, p. 590–595, 2010.

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

MacFIE, H. J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effect in halls tests. **Journal of Sensory Studies**, Westport, v.4, n.2, p.129-148, 1989.

Mattes RD. The taste of fat elevates postprandial triacylglycerol. **Physiological Behavior**, v.74, p. 343–348, 2001.

Mccaughy S. Mechanisms of taste perception and physiological controls. In **Reducing Salt in Foods: Practical Strategies** (Eds Guinee TP & O’Kennedy BT). Boca Raton, LA, USA: CRC Press. pp. 77–98, 2007.

MEILGAARD, M. R.; CIVILLIE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 387p, 1999.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. Boca Raton: CRC Press, 218 p, 2007.

MONDRAGON-BERNAL, O; RODRIGUES, M. I; ANDRE BOLINI, H. M; e MAUGERI, F. Optimization Of Synbiotic Fermented Food From Hydrosoluble Soy Extract Applying Experimental Design And Sensory Analysis Techniques. **Journal of Sensory Studies**, v. 25, p. 371–389, 2010.

MOSKOWITZ, H. R. Ratio scales of sugar sweetness. **Perception & Psychophysics**, v.7, p.315-20, 1970.

MOSKOWITZ, H. R. Sensation And Measurement: **Papers In Honor Of S.S. Stevens**.Dordrecht: Reidel Press, 1974.

PARODIA, C.G. Desenvolvimento de Queijo Cottage Simbiótico. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D. J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.60-69, 2003.

PEREIRA LC, DE SOUZA CHB, BEHRENS JH, SAAD SMI.. Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic petit-suisse cheese. **Acta Aliment Hung.**, v. 39, p.265–76, 2010.

PHAN, V.A., YVEN, C., LAWRENCE, G., CHABANET, C., REPARET, J.M., SALLES, C. In vivo sodium release related to salty perception during eating model cheeses of different textures. **International Dairy Journal**, v.18, n.9, p. 956-963, 2008.

POPPER, R; e KROLL, J.J. Issues And Viewpoints. Conducting Sensory Research With Children. **Journal of Sensory Study**, v. 20, p. 75–87, 2005.

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

SILVA, T.L.T; SOUZA, V.R; PINHEIRO, A.C.M; NUNES, C.A; MARQUES,T.V. Equivalence salting and temporal dominance of sensations analysis for different sodium chloride substitutes in cream cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, 2013.

SOARES,C.P. Influência da redução de sal nas propriedades do queijo de São João da ilha do Pico. **Tese (Doutorado em Qualidade Alimentar)**, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

SOCIETY OF SENSORY PROFESSIONALS. **Penalty Analysis**. Disponível em:< <http://www.sensorysociety.org/knowledge/sspwiki/Pages/Penalty%20Analysis.aspx> >. Acesso em 17 de dezembro de 2013.

SOLER L. Development of non-dairy frozen dessert containing soy protein and coconut milk [**MS thesis**]. Baton Rouge, La.: Louisiana State Univ. 74p , 2005.

SOUZA, V.R; FREIRE, T.V; SARAIVA, C.G; CARNEIRO, J.D. S; PINHEIRO, A.C.M; NUNES C.A. Salt equivalence and temporal dominance of sensations of different sodium chloride substitutes in butter. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 319–325, 2013.

SOUZA, C. H. B; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yogurt starter culture and implications on physicochemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT Food Science and Technology**,v. 42, p. 633–640, 2009.

STEVENS, S. S. The direct estimation of sensory magnitudes-loudness. **The American Journal of Psychology**, v. 69, 1956.

STONE, H; OLIVER, S.M. Measurement Of The Relative Sweetness Of Selected Sweeteners And Sweetener Mixtures. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 215-222, 1969.

STONE, S. and SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation of Food**. 2nd Ed., p. 111, Academic Press, Redwood City, CA, 1993.

SVENSSON U. Industrial Perspectives. In: Tannock GW, editor. **Probiotics: A Critical Review**. Wymondham (GB): Horizon Scientific Press. p. 57-64, 1999.

VICKERS, Z. Sensory Specific Satiety in Lemonade Using a Just Right Scale For Sweetness.**Journal of Sensory Studies** v. 3, n. 1, p. 1-8, 1988.

VINDEROLA, C.G., PROSELLO, W., GHIBERTO, D., REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*)

and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.1905-1911, 2000.

YONEZAWA, S.; XIAO, J.Z.; ODAMAKI, T.; ISHIDA, T.; MIYAJI, K.; YAMADA, A.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1815-1823, 2010.

WYATT, C.J. Acceptability of reduced sodium in breads, Cottage cheese, and pickles. **Journal of Food Science**, v. 48, p.1300-1302, 1983.

YE Q, HECK GL & DESIMONE JA. The anion paradox in sodium taste reception: resolution by voltage-clamp studies. **Science**, v. 254, p.726–742, 1991.

YE Q, HECK GL & DESIMONE JA. Voltage dependence of the rat chorda tympani response to Na⁺ salts: implications for the functional organization of taste receptor cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 70, p.167–178, 1993.

Capítulo 3

Queijo Cottage Probiótico Reduzido de Sódio: Aspectos Físico-Químicos, Microbiológicos e Perfil de Textura

Manuscrito submetido à revista *Food Chemistry*

Resumo

O efeito da substituição parcial de NaCl por sais substitutos em queijo Cottage adicionado de bactérias probióticas foi investigado durante 28 dias de estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. A composição química, a sobrevivência de bactérias probióticas e da cultura *starter*, pH, atividade proteolítica, análise do perfil de textura, perfil de ácidos graxos e ácidos orgânicos foram analisados para determinar os efeitos da substituição nos parâmetros de qualidade do queijo Cottage. As contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* variaram de 7,74 a 6,20 e 8,58 a 7,93 log (UFC. g^{-1}), respectivamente no primeiro e no último dia de estocagem, com valores suficientes para benefícios à saúde humana. Porém, as contagens da cultura *starter* permaneceram baixas com valores abaixo de 3,0 log UFC. g^{-1} para todas as formulações. As formulações que apresentavam o sal MgCl_2 em sua composição foram as que apresentaram menores valores de pH, sendo, o ácido láctico, o ácido orgânico mais encontrado em todas as formulações seguido pelo ácido cítrico e ácido acético. A atividade proteolítica foi quantificada por medição dos aminoácidos e peptídeos produzidos pelas culturas lácticas e probióticas usando o reagente o-fitaldialdeído (OPA) e os resultados demonstraram que a formulação controle (100% NaCl sem probióticos) foi a que apresentou menor atividade proteolítica durante 28 dias de estocagem refrigerada, diferindo estatisticamente das demais formulações. Durante o período de estocagem houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de cálcio, magnésio e potássio em todas as formulações, exceto para as quais continham o sal MgCl_2 . Todos os queijos desse estudo podem ser classificados como baixo teor de gordura, porque o teor de gordura variou de $4.33 \pm 0.07\%$ a $4.69 \pm 0.11\%$, e muito alta umidade ($74.60 \pm 0.47\%$ e $75.59 \pm 0.03\%$), segundo a legislação brasileira. Em geral, não existiram diferenças significativas na adesividade e elasticidade entre queijos experimentais no mesmo período de armazenamento. A adição de culturas probióticas e a redução de sódio não provocaram mudanças significativas no perfil de ácidos graxos em todos os queijos formulados. Os queijos tipo Cottage produzido nesse estudo apresentam

características promissoras como alimento funcional e com boas perspectivas para comercialização.

Palavras-Chave: • queijo Cottage • redução de sódio • bactérias probióticas • perfil de textura

3.1 Introdução

Alimentos contendo bactérias probióticas são classificados como alimentos funcionais e esses produtos vêm ganhando popularidade e aceitação por parte dos consumidores mundialmente (ONG et al., 2006). O queijo é um dos produtos alimentícios mais versáteis disponíveis atualmente, entretanto, o desenvolvimento de queijos probióticos implica, obrigatoriamente, no conhecimento de todas as suas etapas de processamento, bem como do nível de influência no processamento, seja positiva ou negativa, e na sobrevivência desses micro-organismos durante a vida de prateleira dos produtos (WILKINSON et al., 2001).

O queijo é considerado um gênero alimentício com elevados níveis de sódio, portanto a redução do conteúdo de sódio nesse tipo de produto poderá contribuir para a redução do consumo geral de sódio pelos consumidores (AGARWAL et al., 2011), representando, adicionalmente, um enorme desafio para a indústria de laticínios, uma vez que o sal exerce funções específicas no sabor, textura e extensão do tempo de prateleira (AYYASH et al., 2011; AYYASH & SHAH, 2010; GUINEE & FOX, 2004; KATSIARI et al., 1997 e 2000). Embora os queijos frescos não sofram maturação, alguns eventos bioquímicos como a proteólise, podem ocorrer durante o período de armazenamento devido à adição de micro-organismos probióticos produtores de enzimas proteolíticas.

Outro desafio para a indústria de laticínios quando se reduz a concentração de sal em queijos é que se verificam nesses produtos aumentos na proteólise, na atividade da água, na acidez e no amargor, e redução da firmeza, ocorrendo também fermentações irregulares (AYYASH & SHAH, 2010).

Vários tipos de queijo com teor reduzido de sódio têm sido desenvolvidos mediante a redução de NaCl, por si só, ou por substituição parcial/total deste sal por KCl, MgCl₂ e CaCl₂. De modo geral, os resultados são positivos, sendo que a maioria das variedades dos queijos apresenta uma boa aceitação. Segundo estudos realizados por Guinee & Fox, 2004; Lindsay et al., 1982, o cloreto de potássio (KCl) tem sido reconhecido como o substituto potencial do cloreto de sódio, sendo que a mistura NaCl:KCl tem sido usada com sucesso em vários queijos, sem qualquer

efeito adverso na qualidade do queijo, tais como o Feta, o Kefalograviera, e o Cheddar (AYYASH & SHAH, 2010).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as implicações decorrentes da adição das culturas probióticas e da redução de sódio nas características físico-químicas do queijo tipo Cottage ao longo da vida de prateleira do produto estocado a 5°C.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Elaboração de queijo Cottage probiótico reduzido de sódio

No processamento do queijo Cottage foram utilizados matéria-prima e produtos conhecidos no mercado pela qualidade, foram seguidas as boas práticas de fabricação e foi realizada a higienização da área de processamento. Todo esse procedimento foi seguido para que fosse possível a obtenção de um produto de boa qualidade com menores riscos de contaminação microbológica.

O processamento do queijo Cottage foi realizado de acordo com ARAÚJO et al. (2009) com algumas modificações. Na fermentação de 60L de leite desnatado e pasteurizado (0% de gordura, Tipo A, Xandô, Araras, Brasil), aquecido à temperatura de 37°C, foram adicionados CaCl_2 ($0,25\text{g.L}^{-1}$) e a cultura *starter* composta pelos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 (Chr Hansen), na forma DVS (*direct vat set*), previamente pesada (5% p/v), correspondendo ao valor de $9 \log\text{UFC.g}^{-1}$ no produto final. Após um período de fermentação de 16h, no qual o pH do leite atingiu um valor de 4,6, houve a formação da coalhada. A massa foi cortada e em seguida procedeu-se o aquecimento lento até temperatura final de 50°C para a obtenção de grãos firmes e textura compacta. Na etapa seguinte, foi realizado o dessoramento, três lavagens consecutivas da massa com água gelada (3 a 4°C) e adição do *dressing*. Adicionou-se, em relação ao peso final do queijo, 30% de *dressing* (líquido cremoso), composto de creme de leite pasteurizado (17% gordura, Nestlé, Brasil) adicionado de leite desnatado UHT (0% de gordura, Lider, Brasil) para padronizar o teor de gordura até

4% (produto final). No *dressing*, foram adicionadas as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr Hansen, Valinhos, Brasil), na forma DVS (*direct set vat*), previamente pesadas (5% p/v), de forma a atingir uma contagem final de $9 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (de acordo com as recomendações do fabricante).

Para cada tratamento foram adicionados os demais ingredientes diretamente ao *dressing*: sorbato de potássio (0,10% p/p) e os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio (MgCl_2) nas diferentes concentrações (definidas pelos testes do ideal e estimativa de magnitude). Os queijos foram colocados em potes de polipropileno, e imediatamente armazenados em câmara frigorífica a 5°C para resfriamento, de onde foram coletadas as amostras para realização das análises periodicamente.

Os 60L de leite desnatado e pasteurizado utilizados renderam 6.500 ± 0.200 Kg de massa de queijo Cottage por processamento. Sendo que cada Kg de queijo Cottage é composto de 300 g de *dressing*.

Foram elaboradas 6 formulações de queijo Cottage e para cada uma foram adicionados os demais ingredientes diretamente ao *dressing*: sorbato de potássio (0,10% p/p) e os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio (MgCl_2). As formulações elaboradas foram:

- F1: NaCl (100% sem probióticos)
- F2: NaCl (100% com probióticos).
- F3: NaCl/KCl (75:25% com probióticos).
- F4: NaCl/KCl (50:50% com probióticos).
- F5: NaCl/KCl/ MgCl_2 (50:25:25% com probióticos).
- F6: NaCl:KCl: MgCl_2 (75:12,5:12,5% com probióticos)

As concentrações dos sais foram definidas pelos testes do ideal e estimativa de magnitude e todas são equivalentes à concentração 1,12% (p/p) de NaCl. Os queijos foram colocados em potes de polipropileno, e imediatamente armazenados em câmara frigorífica a 5°C para resfriamento, de onde foram coletadas as amostras para realização das análises periodicamente.

3.2.2 Contagem seletiva das culturas

Para as análises de viabilidade das culturas utilizadas, as metodologias utilizadas foram: contagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, foi realizada por plaqueamento em profundidade de 1 mL de cada diluição em Ágar M17 (Himedia Laboratories, Mumbai, India), com adição de 5%(v/v) de solução de lactose a 10%(p/v), seguida de incubação aeróbica a 30 °C/ 48 horas (IDF, 1997).

Para *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi utilizado o meio MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, India) com 10% (v/v) de solução de maltose 20% (p/v), as placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 72 horas (IDF, 1999).

Para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 foi enumerado utilizando MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, India) com adição de 100 mL de solução de glicose a 20%(p/v), 5 mL de solução de dicloxacilina 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. Posteriormente à inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (Oxoid, São Paulo, SP) a 37 °C por 72 horas (CHRISTIAN HANSEN, 1999). Todos os meios de cultura foram previamente testados, com o objetivo de garantir o crescimento seletivo desses micro-organismos. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata e foram monitorados durante o período de estocagem refrigerada do queijo Cottage, nos dias 1, 14, e 28.

3.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado utilizando potenciômetro marca Digimed (São Paulo - SP), modelo DM-20, a 25°C, com determinação por inserção direta do eletrodo nas amostras (BRASIL, 2006).

3.2.4 Produção de metabólitos pelas culturas microbianas

A quantificação dos produtos metabólitos das culturas microbianas, a saber, ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico, foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O método de HPLC seguiu o procedimento desenvolvido por Marsili, Ostapenko e Green (1981) com ajustes. A análise foi realizada utilizando um sistema modular Shimadzu LC-10 (Columbia, MD), composto por uma bomba LC-10AT VP, um forno de coluna CTO-10AS VP, um detector de arranjo de diodos VP SPD-M20A (DAD), um SCL-interface de 10A e uma classe VP Workstation. Uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (BioRad, Hercules, CA, EUA) foi utilizada com uma temperatura de forno de 35°C. O DAD foi operado entre 200 e 800 nm. Cromatogramas de análise quantitativa foram extraídos a 210 nm. As amostras foram eluídas em 0,5 mL min⁻¹ com um modo isocrático com ácido sulfúrico 0.009N. O volume de injeção foi fixado em 20 µL para todas as análises.

A preparação das amostras em duplicata seguiu a metodologia desenvolvida por Donkor et al. (2005), com modificações, e consistiu na mistura de 1 g de queijo com 14 µL de 15,5 N (15,5M) ácido nítrico para posterior diluição com 5 mL da fase móvel 0,009N (0,0045M) ácido sulfúrico. A mistura resultante foi homogeneizada em vortex por 1,5min. Em seguida, foi colocada em banho-maria por 1h a 50°C. O 1,5ml do sobrenadante foi passado para o *ependorf* para ser centrifugado a 4.000G (3.500 RPM) a 4°C por 20min. A solução fracionada (1,5ml) sobrenadante foi centrifugada novamente em um *ependorf* por 14.000G (6.500 RPM) por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em Millipore 0.45 µm e transferido para *ependorfs* (aprox. 1ml).

Os ácidos orgânicos foram quantificados por análise de um extrato do queijo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e quantificado por um método de padrão externo. As soluções-padrão de concentrações conhecidas de ácido acético e ácido láctico (100, 80, 60, 40, 20 e 10 µg mL⁻¹) e ácido cítrico (200, 180, 160, 140, 120 e 100 µg mL⁻¹), foram utilizadas. Os padrões foram injetados em triplicata e os cromatogramas

correspondentes obtidos para cada um. Os gráficos foram obtidos com 6 pontos de concentração e as áreas obtidas foram comparadas com as respectivas concentrações.

As concentrações dos ácidos orgânicos foram calculadas para cada tratamento por interpolação das áreas. As concentrações foram expressas em mg de cada ácido orgânico por grama de queijo, numa base no peso seco. Os picos de ácidos orgânicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção (RT) e confirmados por comparação dos espectros de UV com as dos materiais de referência.

3.2.5 Avaliação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi verificada através da medida dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas utilizando o reagente o-fitaldialdeído (OPA), seguido de leitura da absorbância a 340nm em espectrofotômetro (MASUDA et al., 2005).

3.2.6 Composição centesimal e análise de minerais

A análise dos minerais cálcio, magnésio, sódio e potássio foi realizada em triplicata utilizando um espectrômetro de emissão atômica induzida por plasma (ICP-OES, marca Varian, Mulgrave Victoria, Austrália, modelo Vista MPX) com vista axial, potência 1000 W, fluxo do gás no plasma de 15 L/ min, e linhas de nebulização 589,592, 766,491, 317,933 e 279,553 para sódio, potássio, cálcio e magnésio respectivamente seguindo metodologia descrita por Horwitz et al. (2006).

A umidade foi determinada através de secagem em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 horas. A proteína foi determinada com base no total de nitrogênio, utilizando o método de Kjeldahl com posterior multiplicação pelo fator 6,38. (AOAC, 2006). O teor de gordura foi realizado utilizando o método BLIGH & DYER (1959).

3.2.7 Perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa, após esterificação utilizando método de Hartman e Lago (1973). A gordura

dos queijos foi extraída de acordo com o método da AOAC (1995). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com o método Ce 1-62 (AOCS, 2004). Foi empregado um cromatógrafo capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, dotado de coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl - methylpoysiloxane, dimensões 60 m, ϕ int: 0,25 mm, 0,25 μ m filme). Temperatura do forno de 110°C – 5 min, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: Hélio; split: 1:50; volume injetado: 1,0 μ L. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.

A concentração dos ácidos graxos foi calculada em porcentagem (%) em relação ao total de gordura do queijo. A seguir, os ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI) e CLA (ácido linoléico conjugado) foram identificados.

3.2.8 Análise de textura instrumental (TPA)

A determinação do perfil de textura foi realizada em texturômetro TA-XT2, utilizando probe cilíndrico de alumínio de 25 mm de diâmetro (P25). As determinações dos parâmetros de textura das formulações foram realizadas no primeiro dia e após 28 dias de armazenamento refrigerado. O perfil de textura dos queijos foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras com peso constante, contidas nas embalagens de vidro. Foram analisados os atributos primários firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade. Foram empregados os seguintes parâmetros: amostras de queijo Cottage com altura de 2 cm, diâmetro de 5 cm, temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$, distância de 10 mm e velocidade de compressão de 1 mm/s. O perfil de textura foi acompanhado nas seis formulações dos queijos F1, F2, F3, F4, F5 e F6. O teste foi feito em setuplicada (BURITI et al., 2008).

3.2.9 Análise estatística

Os processos foram realizados em duplicata e as análises foram realizadas em triplicata, exceto para a análise de viabilidade das culturas, ácidos graxos e

ácidos orgânicos que foram realizadas em duplicata. As similaridades e diferenças entre os dados obtidos nas repetições dos processos e dos diferentes tratamentos foram observados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de médias de Tukey, a 5% de significância.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Contagem seletiva das culturas

As contagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704 (Tabela 1) se apresentaram na faixa de $<10 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para a formulação F1 durante todo o período de armazenamento (28 dias). Para as outras formulações (F2, F3, F4, F5 e F6) as contagens da cultura *starter* permaneceram baixas com valores abaixo de $3,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para todas as formulações, havendo diferença estatística entre as formulações apenas nas contagens do dia 28 ($p < 0,05$), porém, o tempo não influenciou ($p > 0,05$) a viabilidade da cultura *starter*. Provavelmente, as contagens permaneceram baixas devido ao processo de três lavagens consecutivas da massa do queijo Cottage, o que poderia ter diminuído a quantidade da cultura *starter*.

Com relação às culturas probióticas, as contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* variaram de 7,74 a 6,20 e 8,58 a 7,93 $\log (\text{UFC.g}^{-1})$, respectivamente, no primeiro e no último dia de estocagem. O tempo de armazenamento influenciou a viabilidade das culturas probióticas utilizadas nesse estudo ($p < 0,05$), exceto para a viabilidade de *Bifidobacterium lactis* nas formulações F4 e F6 ($p > 0,05$). Esses resultados confirmam a aptidão do queijo Cottage como matriz alimentícia capaz em ser suplementada com bactérias probióticas com contagens suficientes para benefícios à saúde humana, o que é corroborado com trabalhos prévios (ARAÚJO et al., 2009; PARODIA, 2010).

Segundo um trabalho realizado por Gomes et al. (1998), os autores afirmam que *Lactobacillus acidophilus* é bastante suscetível às condições de estresse como concentração de sal e temperatura de armazenamento enquanto que o *B.lactis* é

mais resistente a essas condições. Em outro estudo, Gomes et al. (1995) adaptaram a tecnologia do queijo Gouda para produzir um queijo probiótico contendo estirpe de *Bifidobacterium* ssp. e *Lactobacillus acidophilus*. Durante nove semanas de estocagem, a média do número de *Lactobacillus acidophilus* reduziu dois ciclos \log_{10} , enquanto o número de bifidobactérias diminuiu menos que um ciclo \log_{10} . A contagem de células viáveis foi maior que 10^7 UFC.g⁻¹ em ambos os casos. Os autores explicam que o baixo crescimento de *Lactobacillus acidophilus* foi conseqüência da competição com *Bifidobacterium lactis* por fontes de energia e nutrientes.

Alguns estudos confirmam que o queijo tipo Cottage apresenta características desejáveis para incorporação das células probióticas, pois seu processo de produção permite que a bactéria probiótica seja adicionada no final do processo, tornando o queijo apenas uma matriz alimentícia carreadora de células probióticas (ARAÚJO et al., 2009).

Tabela 1 – Contagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 expressos como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Formulação*	Dias de estocagem	<i>Lactococcus lactis</i> (log UFC·g ⁻¹)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC·g ⁻¹)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (log UFC·g ⁻¹)
F1	1	<10	-	-
	14	<10	-	-
	28	<10	-	-
F2	1	2.41 \pm 0.02 ^{a,A}	7.34 \pm 0.03 ^{c,A}	8.02 \pm 0.01 ^{d,AB}
	14	2.26 \pm 0.31 ^{a,A}	7.39 \pm 0.03 ^{a,A}	8.21 \pm 0.03 ^{bc,A}
	28	1.87 \pm 0.24 ^{ab,A}	6.52 \pm 0.11 ^{a,B}	7.93 \pm 0.08 ^{b,B}
F3	1	2,24 \pm 0.34 ^{a,A}	7.74 \pm 0.01 ^{a,A}	8.58 \pm 0.03 ^{a,A}
	14	2.05 \pm 0.08 ^{a,A}	7.21 \pm 0.01 ^{b,B}	8.12 \pm 0.09 ^{c,B}
	28	1.54 \pm 0.04 ^{b,A}	6.20 \pm 0.13 ^{a,C}	7.99 \pm 0.01 ^{b,B}
F4	1	2.88 \pm 0.62 ^{a,A}	7.63 \pm 0.06 ^{ab,A}	8.33 \pm 0.05 ^{bc,A}
	14	2.21 \pm 0.05 ^{a,A}	7.38 \pm 0.03 ^{a,B}	8.28 \pm 0.01 ^{b,A}
	28	1.92 \pm 0.11 ^{a,A}	6.63 \pm 0.03 ^{a,C}	8.15 \pm 0.13 ^{ab,A}
F5	1	2.21 \pm 0.30 ^{a,A}	7.74 \pm 0.06 ^{a,A}	8.47 \pm 0.03 ^{ab,A}
	14	2.32 \pm 0.73 ^{a,A}	7.29 \pm 0.10 ^{ab,AB}	8.41 \pm 0.03 ^{a,A}
	28	1.97 \pm 0.04 ^{a,A}	6.28 \pm 0.40 ^{a,B}	7.99 \pm 0.07 ^{b,B}
F6	1	2.43 \pm 0.23 ^{a,A}	7.60 \pm 0.04 ^{b,A}	8.27 \pm 0.10 ^{c,A}
	14	2.29 \pm 0.27 ^{a,A}	7.17 \pm 0.01 ^{b,B}	8.44 \pm 0.01 ^{a,A}
	28	1,78 \pm 0.12 ^{ab,A}	6.57 \pm 0.04 ^{a,C}	8.25 \pm 0.11 ^{a,A}

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

A, B, C, D, E: Médias com letra maiúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para a mesma formulação ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 c/probióticos).

(-) Formulação sem probióticos

3.3.2 pH

Os resultados de pH estão apresentados na Figura 1. Pode-se observar que as formulações não apresentaram diferença entre os dias avaliados ($p > 0,05$), exceto

para as formulações F3 e F6. Na formulação F3 houve uma variação do pH de 4,70 (1º dia) para 4,62 (14º dia), finalizando o período de estocagem com um pH de 4,65 (28º dia). Na formulação F6 o pH variou de 4,51 (1º dia) para 4,58 (14º dia) e no final apresentou um pH de 4,62 (28º dia).

De modo geral não houve pós-acidificação durante o período de estocagem de 28 dias, pois em todas as formulações o pH final se apresentou ligeiramente superior ao pH inicial, exceto para a formulação F3 onde houve uma ligeira queda de pH ($p < 0,05$) entre o primeiro (4,70) e o último (4,65) dia de estocagem refrigerada.

Segundo Barros (2005) em um estudo realizado com culturas adjuntas em queijo tipo Prato, o aumento do pH pode estar associado com a formação de compostos nitrogenados como aminoácidos, aminas e/ou amônia, oriundos da proteólise que ocorre com o tempo de armazenamento. Outra possível explicação para a não pós-acidificação dos queijos desse estudo seria o aquecimento lento da massa durante o processamento. A lentidão do aquecimento da massa é crucial para expulsar o soro do interior do grão e evitar a formação de uma película que poderia gerar retenção de soro no interior do grão e pós acidificar o produto, além de ocasionar a perda da textura do queijo (ARAÚJO, 2007).

A proteólise contribui para um aumento no pH pela liberação de substâncias intracelulares, com a capacidade tamponante adequada (ligação de íons hidrogênio), bem como por a liberação de amônia a partir de aminoácidos produzidos por proteólise. Esses processos peptidolíticos, que podem aumentar o valor de pH, ocorrem principalmente no final do período de armazenamento (UPADHYAY et al., 2004).

Com relação à adição de culturas probióticas, pode-se observar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as formulações F1 (100% NaCl sem probióticos) e F2 (100% NaCl com probióticos), para o mesmo dia de estocagem. No que se refere ao uso de sais substitutos do NaCl, as formulações F5 e F6 foram as que apresentaram menores valores de pH, e ambas apresentavam o sal $MgCl_2$ em sua composição.

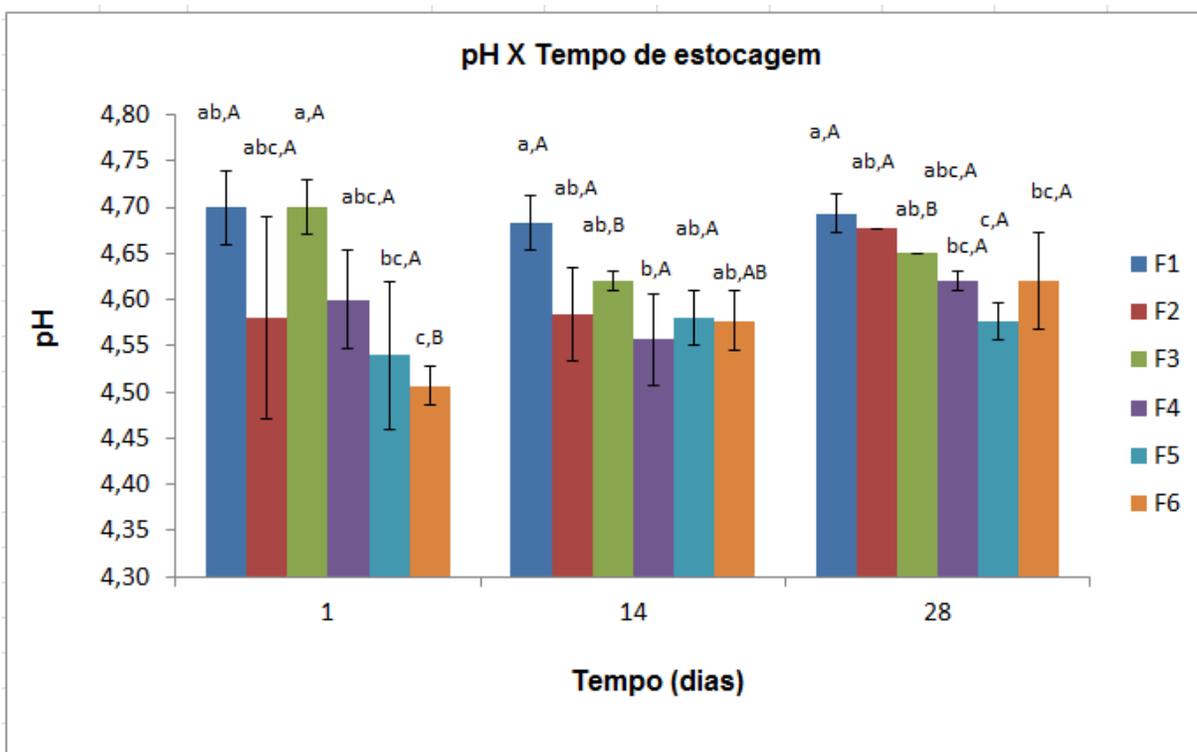


Figura 1: Média \pm desvio padrão dos valores de pH de todas as formulações de queijo Cottage durante período de estocagem a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Letras minúsculas iguais entre as formulações no mesmo dia não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

Letras maiúsculas iguais entre os dias na mesma formulação não diferem entre si ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos)

3.3.3 Produção de metabólitos pelas culturas microbianas

A Tabela 2 mostra os resultados das análises de ácidos orgânicos nos queijos Cottage probióticos produzidos com diferentes sais hipossódicos. O ácido lático foi o ácido orgânico mais encontrado em todas as formulações, apresentando valores entre 8.84 ± 1.24 e $3.51 \pm 0.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente, no primeiro e no último dia de estocagem da formulação F2, que foi onde esse ácido foi encontrado em maior quantidade no primeiro dia de estocagem refrigerada. No final do período de estocagem de 28 dias, todas as formulações apresentaram quantidade de ácido

lático entre 3.51 ± 0.28 e $4.60 \pm 0.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) uma da outra. O tempo de estocagem teve influência significativa ($p < 0,05$) nas formulações, pois houve uma diminuição na quantidade de ácido lático do primeiro para o último dia em todas as formulações. Em um estudo realizado por García et al., (2013) em queijo Cottage probiótico adicionado de *Lactobacillus casei*, a atividade metabólica do probiótico foi avaliada durante 28 dias de estocagem refrigerada a 8 °C, os autores confirmaram que a produção do ácido lático é mais abundante do que o ácido acético em queijos frescos e armazenados. Porém, diferentemente dos resultados encontrados nesse estudo, a concentração de ácido lático aumentou ligeiramente durante o tempo de armazenamento de $7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para cerca de $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ presumivelmente devido à fermentação de lactose residual. A lactose residual é metabolizada rapidamente a ácido lático durante as fases iniciais da maturação do queijo, a uma taxa em grande parte determinada pela temperatura, níveis de sal e pela sua microbiota. Cerca de 98% da lactose do leite é eliminada através do soro durante a produção do queijo (ONG e SHAH, 2008). Isso explica a quantidade relativamente baixa de ácido lático encontrada nas formulações de queijo Cottage em comparação com outros estudos, pois o processo de lavagem da massa, decorrente do processamento desse tipo de queijo, pode diminuir a quantidade de lactose residual no produto final.

Com relação ao ácido acético (Tabela 2), a quantidade desse ácido aumentou ($p < 0,05$) durante as duas primeiras semanas de estocagem nas formulações F4 e F6, sendo essas duas formulações as que apresentaram maior quantidade de ácido no final do período de estocagem de 28 dias.

De modo geral, a quantidade de ácido acético encontrada nas formulações de queijo Cottage nesse estudo foi baixa, o que pode se constituir em uma vantagem sob o ponto vista sensorial. Uma grande quantidade de ácido acético é responsável por decréscimo da aceitação de produtos lácteos probióticos (GRANATO et al., 2010; CRUZ et al., 2012).

O ácido cítrico (Tabela 2) foi o segundo ácido orgânico mais encontrado nas formulações de queijo Cottage desse estudo, sendo a formulação F4 a que

apresentou maior quantidade desse ácido ao longo do período de estocagem ($2.63 \pm 0.82 \text{ mg.g}^{-1}$), porém sem diferença estatística da formulação controle F1 ($2.09 \pm 0.10 \text{ mg.g}^{-1}$). Sabe-se que o ácido cítrico está envolvido no ciclo de Krebs tanto como substrato como produto. Adicionalmente, também pode ser usado como substrato por bactérias fermentadoras de ácido cítrico com produção de ácido pirúvico, dióxido de carbono e ácido acético (BOUZAS et al., 1993).

3.3.4 Avaliação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada por medição dos aminoácidos e peptídeos produzidos pelas culturas lácticas probióticas usando o reagente o-fitaldialdeído (OPA), seguido de leitura da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro nos dias 1, 14 e 28.

Como pode ser visto na Tabela 2, a formulação controle F1 (sem probióticos e 100% de NaCl) foi a que apresentou menores índices de proteólise ao longo da estocagem e houve diferença significativa ($p > 0,05$) da proteólise durante o tempo de armazenamento dessa formulação. A atividade proteolítica das bactérias do ácido láctico, incluindo bactérias do fermento e as probióticas, têm sido estudadas extensivamente, sendo suas enzimas isoladas e caracterizadas (SHIHATA e SHAH, 2000). Dessa forma, os resultados de proteólise nas formulações F2, F3, F4, F5 e F6, encontrados nesse estudo com queijo Cottage probiótico e que se mostraram superiores aos resultados da formulação F1 ($p < 0,05$), podem ser justificados pela atividade proteolítica também dos micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, capazes de clivar as cadeias protéicas em oligopeptídeos e/ou aminoácidos livres.

Para todas as formulações houve um aumento da proteólise com o tempo de estocagem ($p > 0,05$), sendo a formulação F6 (NaCl:KCl:MgCl₂ 75:12,5:12,5 com probióticos) a que apresentou maior índice (0.197 ± 0.000), diferindo estatisticamente da formulação controle F1 ($p > 0,05$). Os queijos frescos, com limitada vida de prateleira sob estocagem refrigerada, têm como principal evento a proteólise primária, que é realizado pelos agentes de coagulação e, em menor medida, pela

plasmina, coagulantes residuais e pelas enzimas das culturas *starters* (SOUSA et al, 2001). A suplementação de queijos com bactérias probióticas só tem um efeito relevante sobre a proteólise secundária, resultando num aumento do teor total de aminoácidos livres e na formação de compostos responsáveis pelo sabor e aroma, que são resultantes do catabolismo destes aminoácidos (CRUZ et al., 2009).

Segundo dados da literatura, o *Lactobacillus acidophilus* produz aminopeptidases, dipeptidases e proteinases intracelulares (KHALID e MARTH, 1990; SHIHATA e SHAH, 2000; UPADHYAY et al., 2004), levando à hipótese de que este micro-organismo pode contribuir para o aumento da proteólise secundária nos queijos (BERGAMINI et al., 2009).

No presente estudo com queijo Cottage probiótico pode-se concluir que a proteólise é resultante a ação das enzimas da cultura *starter* e das culturas probióticas já que o queijo Cottage desse estudo é um queijo de coagulação ácida e que não possui ação do coalho no seu processamento.

Tabela 2 - Valores de ácidos orgânicos e proteólise expressos como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante estocagem por 28 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Formulação*	Dias de estocagem	Ácido láctico (mg·g ⁻¹)	Ácido acético (mg·g ⁻¹)	Ácido cítrico (mg·g ⁻¹)	Proteólise**
F1	1	7.38 \pm 0.65 ^{b,A}	0.10 \pm 0.01 ^{b,A}	1.54 \pm 0.07 ^{cd,A}	0.091 \pm 0.000 ^{b,C}
	14	3.73 \pm 0.27 ^{c,B}	0.12 \pm 0.00 ^{c,A}	1.89 \pm 0.32 ^{b,A}	0.092 \pm 0.001 ^{c,B}
	28	4.60 \pm 0.20 ^{a,B}	0.10 \pm 0.02 ^{a,A}	2.09 \pm 0.10 ^{ab,A}	0,119 \pm 0.000 ^{c,A}
F2	1	8.84 \pm 1.24 ^{a,A}	0.14 \pm 0.00 ^{a,A}	1.38 \pm 0.13 ^{d,B}	0.145 \pm 0.002 ^{a,B}
	14	3.92 \pm 0.26 ^{bc,B}	0.15 \pm 0.01 ^{bc,A}	2.33 \pm 0.14 ^{ab,A}	0.158 \pm 0.002 ^{ab,A}
	28	3.51 \pm 0.28 ^{a,B}	0.09 \pm 0.00 ^{a,B}	1.78 \pm 0.36 ^{b,AB}	0,142 \pm 0.005 ^{bc,B}
F3	1	3.17 \pm 0.06 ^{e,C}	0.15 \pm 0.01 ^{a,A}	1.36 \pm 0.05 ^{d,B}	0.131 \pm 0.029 ^{a,B}
	14	4.11 \pm 0.07 ^{bc,B}	0.14 \pm 0.00 ^{bc,A}	1.94 \pm 0.01 ^{b,AB}	0.148 \pm 0.019 ^{b,AB}
	28	4.38 \pm 0.04 ^{a,A}	0.12 \pm 0.00 ^{a,B}	2.06 \pm 0.06 ^{ab,A}	0.197 \pm 0.000 ^{a,A}
F4	1	3.53 \pm 0.14 ^{de,C}	0.14 \pm 0.01 ^{a,B}	2.67 \pm 0.08 ^{ab,A}	0.124 \pm 0.000 ^{a,B}
	14	5.03 \pm 0.12 ^{b,A}	0.17 \pm 0.01 ^{b,A}	1.76 \pm 0,05 ^{b,B}	0.144 \pm 0.000 ^{b,A}
	28	4.56 \pm 0.02 ^{a,B}	0.11 \pm 0.01 ^{a,C}	2.63 \pm 0.82 ^{a,A}	0,144 \pm 0.010 ^{bc,A}
F5	1	4.35 \pm 0.10 ^{cd,AB}	0.16 \pm 0.01 ^{a,A}	2.24 \pm 0.00 ^{bc,A}	0.143 \pm 0.000 ^{a,A}
	14	4.87 \pm 0.06 ^{bc,A}	0.17 \pm 0.00 ^{b,A}	1.72 \pm 0.00 ^{b,AB}	0.170 \pm 0.015 ^{a,A}
	28	4.14 \pm 0.24 ^{a,B}	0.11 \pm 0.00 ^{a,B}	1.63 \pm 0.14 ^{b,B}	0,176 \pm 0.053 ^{ab,A}
F6	1	4.94 \pm 0.11 ^{c,B}	0.16 \pm 0.00 ^{a,B}	3.03 \pm 0.07 ^{a,A}	0.142 \pm 0.008 ^{a,B}
	14	7.30 \pm 0.08 ^{a,A}	0.24 \pm 0.02 ^{a,A}	3.07 \pm 0.05 ^{a,A}	0.160 \pm 0.010 ^{ab,A}
	28	4.09 \pm 0.33 ^{a,B}	0.12 \pm 0.01 ^{a,C}	1.77 \pm 0.07 ^{b,B}	0,172 \pm 0.001 ^{ab,A}

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

A, B, C,D, E: Médias com letra maiúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para a mesma formulação ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

**Proteólise está expressa em absorbância a 340 nm.

3.3.5 Análise dos minerais.

As concentrações totais de Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ e Na^+ nos queijos Cottage probióticos durante o período de armazenamento estão representadas na Tabela 3. Os queijos foram analisados no primeiro e no último dia de estocagem refrigerada a fim de se verificar as mudanças ocorridas durante esse período.

Pode-se observar que durante o período de estocagem houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de Ca^{+2} e Mg^{+2} em todas as formulações, exceto para F5, onde o ligeiro aumento não foi significativo ($p > 0,05$) e F6 (não significativo para a concentração de Mg^{+2}). Com relação à concentração de K^+ , durante o período de estocagem refrigerada de 28 dias, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nas formulações F1, F2, F3 e F4. O aumento das concentrações dos minerais (potássio e magnésio) durante o tempo de estocagem, possivelmente foi devido à porosidade dos queijos, pois tem sido relatado que os queijos com teores de umidade mais elevados, como os queijos frescos, absorvem sal mais rapidamente devido à maior porosidade (GEURTS et al., 1974; MELILLI et al., 2003).

Comparando os queijos Cottage probióticos das formulações com redução de sódio (F3, F4, F5 e F6), com o queijo Cottage probiótico da formulação F2 (100% NaCl com probióticos), pode-se observar que as concentrações de Ca^{+2} nas formulações hipossódicas se apresentaram ligeiramente maiores que na formulação F2. Estes resultados concordam com os de Gomes et al., (2011), que relataram resultados semelhantes em queijo Minas frescal probiótico, e segundo Guinee (2004), a remoção de sódio promove uma redução na solubilização de cálcio a partir da matriz caseína para-caseína, com um efeito direto sobre o nível de cálcio coloidal, resultando em maior retenção do cálcio na matriz de queijo.

Com relação ao teor de Na^+ , como mostrado na Tabela 3, para as formulações F1, F2, F4 e F6 os conteúdos de Na^+ não aumentaram significativamente ($p > 0,05$) durante o armazenamento. Além disso, a diferença significativa ($p < 0,05$) existente no conteúdo de Na^+ entre os queijos experimentais e o controle (F1), no mesmo período de armazenamento, provavelmente foi devida ao uso dos sais hipossódicos.

Nesse estudo, os queijos elaborados com os sais hipossódicos tiveram um teor de Na⁺ variando de 230,41 a 351,40 mg de Na⁺ por porção de 100 g de queijo, sendo que não podem ser rotulados como alimentos de “baixo teor em sódio” uma vez que não satisfazem o requisito de um teor não superior a 80 mg de sódio por porção (para queijo Cottage uma porção de 50 g), de acordo com a Resolução RDC 54/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Por essa razão apenas os queijos elaborados nesse trabalho e representados pelas formulações F4 e F5, podem ser rotulados como queijos com “reduzido teor de sódio”, segundo a mesma legislação, que estabelece que produto com sódio reduzido deve apresentar redução de no mínimo 25% de sódio em relação ao produto regular (controle) (BRASIL, 2012).

Em comparação entre três marcas comerciais de queijo Cottage (convencional A, convencional B e probiótica com *Lactobacillus acidophilus*) disponíveis no mercado de produtos lácteos da cidade de Campinas-SP, os teores de sódio encontrados nos rótulos dessas três marcas são superiores aos das formulações F4 e F5 deste estudo. Os valores encontrados variaram de 128 a 195 mg de sódio por porção de 50 g.

Tabela 3 - Valores de cálcio, magnésio, potássio e sódio expressos como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante 28 dias de estocagem refrigerada a $5 \pm 1^\circ\text{C}$

Formulação*	Dias de estocagem	Ca ⁺² (mg/100g)	Mg ⁺² (mg/100g)	K ⁺ (mg/100g)	Na ⁺ (mg/100g)
F1	1	81.05 \pm 1.21 ^{b,B}	6.56 \pm 0.10 ^{c,B}	101.16 \pm 0.91 ^{e,B}	429.89 \pm 1.11 ^{a,A}
	28	98.18 \pm 2.12 ^{a,A}	8.11 \pm 0.21 ^{c,A}	126.72 \pm 2.80 ^{e,A}	425.62 \pm 7.73 ^{a,A}
F2	1	61.81 \pm 1.65 ^{e,B}	5.47 \pm 0.14 ^{c,B}	96.37 \pm 3.97 ^{e,B}	425.02 \pm 10.39 ^{a,A}
	28	85.41 \pm 1.29 ^{c,A}	7.47 \pm 0.11 ^{c,A}	114.58 \pm 1.48 ^{f,A}	429.57 \pm 3.55 ^{a,A}
F3	1	69.09 \pm 1.47 ^{d,B}	5.78 \pm 0.12 ^{c,B}	213.72 \pm 6.52 ^{c,B}	322.91 \pm 7.90 ^{b,B}
	28	97.86 \pm 1.23 ^{a,A}	8.91 \pm 0.23 ^{c,A}	287.05 \pm 3.54 ^{b,A}	351.40 \pm 5.17 ^{b,A}
F4	1	75.69 \pm 1.24 ^{c,B}	6.33 \pm 0.05 ^{c,B}	351.96 \pm 5.70 ^{a,B}	232.18 \pm 5.26 ^{c,A}
	28	101.31 \pm 2.31 ^{a,A}	8.63 \pm 0.20 ^{c,A}	374.71 \pm 5.69 ^{a,A}	241.27 \pm 3.72 ^{d,A}
F5	1	90.44 \pm 0.57 ^{a,A}	35.48 \pm 3.57 ^{a,A}	252.13 \pm 6.48 ^{b,A}	246.88 \pm 0.29 ^{c,A}
	28	91.72 \pm 3.21 ^{b,A}	37.25 \pm 0.99 ^{a,A}	245.45 \pm 3.23 ^{c,A}	230.41 \pm 3.70 ^{d,B}
F6	1	92.54 \pm 2.67 ^{a,B}	22.09 \pm 0.59 ^{b,A}	185.48 \pm 3.71 ^{d,A}	332.63 \pm 5.49 ^{b,A}
	28	97.25 \pm 3.44 ^{a,A}	22.79 \pm 0.99 ^{b,A}	177.77 \pm 4.59 ^{d,B}	330.40 \pm 8.07 ^{c,A}

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

A, B, C, D, E: Médias com letra maiúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para a mesma formulação ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

3.3.6 Composição centesimal.

A composição físico-química dos queijos recém-produzidos e após 28 dias de estocagem refrigerada é apresentada na Tabela 4. As seis formulações de queijo Cottage apresentaram diferença significativa em relação aos teores de umidade entre as formulações para o mesmo dia de estocagem, sendo a formulação F2 (teor de umidade: 76.85 \pm 0.24 %) a que apresentou maior teor de umidade no primeiro dia de estocagem, diferindo estatisticamente das demais ($p < 0,05$). Com relação ao tempo de estocagem, esse só influenciou a formulação F1. Nessa formulação ocorreu um ligeiro aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de umidade.

Nas formulações com sais hipossódicos o teor de umidade não variou com o tempo de armazenamento ($p>0,05$). De modo geral, os teores de umidade de todas as formulações de queijo Cottage desse estudo ficaram em torno de 74.60 ± 0.47 e $75.59\pm 0.03\%$, o que está de acordo com os resultados encontrados por Parodia (2010) para queijo Cottage simbiótico.

Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nos teores de gordura entre os queijos Cottage experimentais com relação ao tempo de estocagem, exceto para as formulações F2 e F4, onde houve uma ligeira queda nos valores do primeiro para o último dia de estocagem. Com relação às diferenças entre formulações, não houve diferença significativa entre as formulações no primeiro dia ($p>0,05$). Todos os queijos podem ser classificados como baixo teor de gordura, porque o teor de gordura variou de 4.33 ± 0.07 a $4.69\pm 0.11\%$, e muito alta umidade, porque os valores de umidade foram maiores que 55% (BRASIL, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados por Blanchette et al. (1996) ao monitorar os aspectos físico-químicas de queijos Cottage fermentado por bifidoactérias.

Com relação à proteína (Tabela 4), os resultados desse estudo demonstraram teores de proteína entre 14.09 ± 0.27 e $16.87\pm 0.56\%$, sendo ligeiramente superiores aos encontrados por Blanchette et al. (1996). Com relação ao período de estocagem, somente houve diferença significativa para a formulação F3 e nenhuma das formulações com sais hipossódicos diferiu estatisticamente da formulação controle F1 no final do período de estocagem de 28 dias. A formulação F2 foi a que apresentou menor teor de proteína no primeiro dia de estocagem ($14.09\pm 0.27\%$) e, conseqüentemente, foi a que apresentou maior proteólise (0.145 ± 0.002) em comparação com as outras formulações nesse mesmo período. Isso sugere que as diferenças estatísticas para proteína encontradas no queijo Cottage podem ter ocorrido devido à atividade proteolítica dos micro-organismos.

A legislação brasileira, até o momento, não possui padrões de identidade e qualidade específicos para queijo Cottage, o que dificulta comparações com base na legislação, sendo que esse estudo pode contribuir nessa direção.

Tabela 4 - Valores de umidade, gordura e proteína expressos como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante estocagem por 28 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Formulação*	Dias de estocagem	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)
F1	1	74.60 \pm 0.47 ^{b,B}	4.50 \pm 0.09 ^{a,A}	15.66 \pm 0.28 ^{a,A}
	28	75.59 \pm 0.03 ^{ab,A}	4.52 \pm 0.05 ^{ab,A}	15.62 \pm 0.90 ^{abc,A}
F2	1	76.85 \pm 0.24 ^{a,A}	4.69 \pm 0.09 ^{a,A}	14.09 \pm 0.27 ^{b,A}
	28	76.34 \pm 0.18 ^{a,A}	4.33 \pm 0.07 ^{b,B}	14.44 \pm 0.59 ^{c,A}
F3	1	75.47 \pm 0.25 ^{b,A}	4.47 \pm 0.06 ^{a,A}	16.87 \pm 0.56 ^{a,A}
	28	75.04 \pm 1.17 ^{ab,A}	4.37 \pm 0.09 ^{b,A}	14.61 \pm 0.28 ^{bc,B}
F4	1	75.20 \pm 0.43 ^{b,A}	4.69 \pm 0.11 ^{a,A}	16.12 \pm 0.62 ^{a,A}
	28	75.25 \pm 0.23 ^{ab,A}	4.39 \pm 0.10 ^{b,B}	16.08 \pm 0.54 ^{ab,A}
F5	1	75.12 \pm 0.85 ^{b,A}	4.52 \pm 0.13 ^{a,A}	16.21 \pm 0.45 ^{a,A}
	28	75.81 \pm 0.05 ^{ab,A}	4.66 \pm 0.13 ^{a,A}	15.78 \pm 0.54 ^{abc,A}
F6	1	74.54 \pm 0.15 ^{b,A}	4.66 \pm 0.04 ^{a,A}	16.32 \pm 0.74 ^{a,A}
	28	74.71 \pm 0.15 ^{b,A}	4.64 \pm 0.07 ^{a,A}	16.72 \pm 0.84 ^{a,A}

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

A, B, C, D, E: Médias com letra maiúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para a mesma formulação ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos).

3.3.7 Perfil de ácidos graxos

A gordura desempenha um importante papel na qualidade sensorial e nutricional de queijos. Além da quantidade de gordura total, a composição de ácidos graxos é essencial. A textura dos queijos depende diretamente do grau de insaturação da gordura, um maior grau de insaturação leva a uma textura mais suave (BUGAUD et al., 2001). Do ponto de vista nutricional, o alto teor de ácidos graxos saturados é um fator limitante para o seu consumo (ZOCK, 2006). Por outro lado, a gordura dos queijos possui ácidos graxos minoritários, tal como o ácido linoleico

conjugado (CLA), que poderia promover favoravelmente a saúde humana (YAQOOB & TRICON, 2006).

Embora a lipólise seja um evento bioquímico mais relevante em queijos curados, o estudo de ácido graxos livres foi realizado para avaliar o efeito do metabolismo do probiótico no padrão lipolítico do queijo Cottage. O perfil de ácidos graxos dos queijos Cottage foi analisado no primeiro e no último dia de estocagem (Tabela 5). Os tratamentos não promoveram diferenças significativas tanto entre formulações como em relação ao tempo de estocagem ($p < 0,05$) para todos os ácidos graxos analisados. Estes resultados são consistentes com os relatados por outros autores em queijo (KATSIARI, VOUTSINAS, ALICHANIDIS & ROUSSIS 2001; LINDSAY, HARGETT & BUSH, 1982).

Como se pode observar no presente estudo, a maior parte dos ácidos graxos do queijo Cottage (Tabela 5) é representada em todas as formulações pela sua fração saturada (AGS), pois ácidos graxos de cadeia curta e elevada proporção de ácidos graxos saturados são os mais presentes na gordura do leite bovino. A composição de ácidos graxos de todas as formulações foi bastante semelhante. O total de ácidos graxos saturados dos tratamentos variou de 62,76% a 64,70%.

Kinik et al. (2005) analisando o perfil de ácidos graxos de queijos turcos encontraram um total de ácidos graxos saturados entre 69.31 ± 0.50 a $66.73 \pm 2.72\%$. O total de ácidos graxos monoinsaturados variou de $29.11 \pm 0.11\%$ a $27.56 \pm 0.09\%$, sendo o ácido oleico (C18:1n9) o principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados em queijos e que nesse estudo apresentaram teores que variaram de 26.34 ± 0.25 a $24.68 \pm 0.02\%$.

Para os ácidos graxos poliinsaturados os valores encontrados variaram entre 5.66 ± 2.64 e $2.62 \pm 0.03\%$.

Os queijos são reconhecidos como os derivados lácteos com maior concentração de ácido linoleico conjugado (CLA) (VAN NIEUWENHOVE et al., 2007). Esta concentração depende da quantidade original de CLA no leite e das condições de processamento (KIM et al., 2009).

O ácido linoleico conjugado (CLA) é um ácido graxo poliinsaturado que compreende um grupo de isômeros posicionais e geométricos derivados de ácido linoleico (C18: 2n-6). Esses compostos são encontrados naturalmente na gordura do leite e da carne de animais ruminantes como resultado do processo de isomeração enzimática do ácido linoleico conduzido pelas bactérias localizadas no intestino desses animais. Adicionalmente, o CLA pode ser produzido industrialmente por meio da isomeração alcalina do ácido linoleico (RISÉRIUS et al, 2001; BRASIL, 2007). Estudos comprovaram a potente atividade anticarcinogênica deste ácido graxo, além de atuar como antioxidante, redutor do peso corporal e como agente anti-aterosclerose, entre outras propriedades fisiológicas (SIEBER et al., 2004; LUNA et al., 2007). Valores estimados de CLA para produzir funções benéficas à saúde seriam em torno de 3,5 g / dia (SILVESTRE et al., 2013).

Vários micro-organismos foram identificados como potenciais produtores de CLA, incluindo estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (CHUNG et al., 2008; COAKLEY et al , 2003; LIN , 2006; RODRIGUEZ et al., 2011). Alguns destes micro-organismos são capazes de efetuar a isomerização e desidratação de alguns ácidos graxos precursores responsáveis pela produção de CLA (KISHINO et al., 2009).

Nesse estudo com queijo Cottage probiótico não foram observadas diferenças significativas no teor de CLA ($p>0,05$) entre os queijos experimentais e o queijo controle F1. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al.,(2011) em estudo com *cream cheese* com diferentes concentrações de inulina e de bactérias probióticas (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*), durante 45 dias de armazenamento a 8 °C.

A quantidade de CLA encontrada nos queijos variou de 0.18±0.00% a 0.29±0.08%, essas quantidades são relativamente baixas quando comparadas a outros tipos de queijos fabricados com leite integral. Alguns estudos mostram que o processo de desnatação (parcial ou total) de leite é responsável pela perda da maior parte do CLA e apenas quantidades vestigiais permanecem neste alimento (SILVESTRE et al., 2013).

Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos expressos em porcentagem (%) como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante estocagem por 28 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Formulação*	Dias de estocagem	AGS	AGMI	AGPI	C18:1n9	CLA
F1	1	68.34 \pm 0.18 ^a	28.26 \pm 0.39 ^a	2.93 \pm 0.22 ^a	25.17 \pm 0.33 ^a	0.23 \pm 0.01 ^a
	28	66.99 \pm 0.17 ^a	29.11 \pm 0.11 ^a	3.31 \pm 0.33 ^a	26.34 \pm 0.25 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a
F2	1	66.73 \pm 2.72 ^a	28.69 \pm 0.74 ^a	4.08 \pm 1.90 ^a	25.85 \pm 1.13 ^a	0.34 \pm 0.18 ^a
	28	68.24 \pm 2.34 ^a	27.90 \pm 1.43 ^a	3.18 \pm 0.69 ^a	25.11 \pm 1.68 ^a	0.21 \pm 0.06 ^a
F3	1	68.78 \pm 0.02 ^a	28.01 \pm 0.03 ^a	2.75 \pm 0.03 ^a	24.91 \pm 0.01 ^a	0.20 \pm 0.00 ^a
	28	69.31 \pm 0.50 ^a	28.83 \pm 1.84 ^a	5.66 \pm 2.64 ^a	26.09 \pm 2.34 ^a	0.29 \pm 0.08 ^a
F4	1	65.79 \pm 2.64 ^a	28.74 \pm 0.32 ^a	4.83 \pm 2.16 ^a	25.90 \pm 0.35 ^a	0.25 \pm 0.06 ^a
	28	68.57 \pm 0.66 ^a	27.56 \pm 0.09 ^a	3.36 \pm 0.73 ^a	24.53 \pm 0.04 ^a	0.18 \pm 0.00 ^b
F5	1	67.79 \pm 0.10 ^a	28.35 \pm 0.13 ^a	3.22 \pm 0.14 ^a	25.22 \pm 0.11 ^a	0.21 \pm 0.00 ^a
	28	67.18 \pm 1.47 ^a	28.86 \pm 0.54 ^a	3.95 \pm 0.83 ^a	25.27 \pm 0.66 ^a	0.21 \pm 0.02 ^{ab}
F6	1	68.72 \pm 0.13 ^a	28.20 \pm 0.14 ^a	2.62 \pm 0.03 ^a	25.15 \pm 0.18 ^a	0.18 \pm 0.01 ^a
	28	69.03 \pm 0.07 ^a	27.64 \pm 0.00 ^a	2.87 \pm 0.08 ^a	24.68 \pm 0.02 ^a	0.18 \pm 0.01 ^b

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos). Abreviaturas: AGS= Σ ácidos graxos saturados; AGMI= Σ ácidos graxos monoinsaturados; AGPI= Σ ácidos graxos poliinsaturados; CLA= ácido linoléico conjugado.

3.3.8 Análise de textura instrumental (TPA)

Devido à alta umidade, os queijos com baixo teor de gordura são caracterizados por apresentarem defeitos de textura, aroma e sabor (BANKS, 2004), uma vez que a alta umidade destes produtos enfraquece a rede de proteínas, resultando em queijos menos firmes (MISTRY & ANDERSON, 1993; MISTRY, 2001). Embora os queijos frescos não sofram maturação, alguns eventos bioquímicos, potencializados por diversas enzimas, decorrentes da adição de micro-organismos,

enzimas e/ou processos utilizados, podem ocorrer durante o período de armazenamento conferindo ao queijo essas alterações de textura, sabor e aroma.

Também o NaCl exerce uma influência significativa nas propriedades físicas do queijo, nomeadamente na sua reologia e textura. Segundo alguns estudos, o queijo salgado com NaCl apresenta uma textura mais firme, enquanto o queijo isento de sal possui uma consistência mais amolecida e cremosa. Em contrapartida, elevadas concentrações de sal resultam num queijo mais duro e quebradiço, tendo este fenómeno sido observado nos queijos como “Gaziantep”, “Domiat” e “Feta” (GUINEE & FOX, 2004).

Dessa forma, existe a necessidade de se verificar quais as mudanças ocorridas nesse atributo durante o período de estocagem dos queijos e, também, caracterizar de forma instrumental os atributos de textura avaliados por testes sensoriais. Alguns autores já estudaram as correlações entre alguns parâmetros de textura com aceitação sensorial, bem como com os índices de proteólise (O'CALLAGHAN & GUINEE, 2004; ALVARENGA, 2008; SOUSA, 2001).

Foram analisados os atributos primários: firmeza, coesividade, adesividade (em módulo) e elasticidade, no primeiro e após 28 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

A firmeza é a força necessária para realizar uma determinada deformação, podendo ser definida também como a força requerida para comprimir o alimento entre os dentes molares ou entre a língua e o palato (SZCZESNIAK, 1998; FOX et al., 2000). Com relação à firmeza, as formulações F2, F4, F5 e F6 apresentaram aumentos significativos ($p < 0,05$) da firmeza durante o tempo de armazenamento de 28 dias, sendo que as formulações F1 e F3 permaneceram estáveis, sem variação significativa ($p > 0,05$) entre o 1º e o 28º dia. Todas as formulações com sais hipossódicos e a formulação F2 diferiram estatisticamente da formulação controle F1 nos dois períodos analisados, sendo que a formulação controle apresentou valores de firmeza maiores que as demais. Uma possível explicação para esse resultado seria o maior índice de proteólise apresentado pelas formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em comparação com a formulação F1, que apresentou o menor índice ao longo de

todo o período de estocagem. A proteólise que ocorre durante o armazenamento dos queijos resulta em modificações na textura deste produto, devido à quebra na sua matriz protéica (FOX, GUINEE, COGAN & MCSWEENEY, 2000).

A adição de sais hipossódicos não interferiu na firmeza dos queijos, já que a formulação F2 com 100% de NaCl não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) das formulações hipossódicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Ayyash et al., (2012) em estudo com substituição parcial de NaCl por KCl em queijos tipo Akawi avaliados durante 30 dias de estocagem a 4°C.

A adesividade é definida como o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e outras superfícies em que o alimento entra em contato, ou ainda, a força requerida para remover o alimento que aderiu ao céu da boca, geralmente o palato, mas também lábios e dentes durante a mastigação (SZCZESNIAK, 1998; FOX et al., 2000). A adesividade, em módulo, de todos os queijos diminuiu significativamente durante as quatro semanas de armazenamento ($p < 0,05$). Para as formulações F2, F3, F4, F5 e F6, a adesividade não diferiu estatisticamente do queijo controle no 1º e no 28º dia de armazenamento (Tabela 6).

A coesividade é definida como a extensão com que um queijo pode ser deformado até que haja ruptura na sua estrutura (FOX et al., 2000). Os valores de coesividade dos queijos estudados mantiveram-se relativamente estáveis sem diferenças significativas ao longo de seu armazenamento ($p > 0,05$), particularmente para as formulações F3 e F6 (Tabela 6). Com relação à diferença do controle, nenhuma formulação diferiu estatisticamente da F1 no último dia de estocagem.

A elasticidade é definida como o grau de recuperação da deformação causada a um pedaço de queijo depois que a força de deformação é removida (FOX et al., 2000). Todos os queijos estudados permaneceram com valores de elasticidade muito próximos ao controle, sem variações significativas ($p > 0,05$) durante toda a vida de prateleira dos produtos (Tabela 6). Em todas as formulações houve uma diminuição significativa do primeiro para o último dia de estocagem ($p < 0,05$). A proteólise está relacionada com o decréscimo nos valores dos parâmetros de textura, entre eles a elasticidade (TUNICK, COOKE, MALIN, SMITH & HOLSINGER, 1997), o que pode

ser evidenciando na formulação F3. Nessa formulação o último dia de estocagem apresentou o menor valor de elasticidade (0.61 ± 0.06), e na análise de proteólise ela foi a formulação que apresentou maior valor (0.197 ± 0.000), nesse mesmo período de análise.

Tabela 6 - Valores dos parâmetros de perfil de textura: firmeza, adesividade, coesividade e elasticidade, expressos como média \pm desvio padrão, em queijo Cottage probiótico nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 durante estocagem por 28 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Formulação*	Dias de estocagem	Firmeza (N)	Adesividade (N.s)**	Coesividade	Elasticidade
F1	1	3.70 ± 0.14 ^{a,A}	2.05 ± 0.37 ^{ab,A}	0.31 ± 0.02 ^{c,B}	0.84 ± 0.04 ^{a,A}
	28	3.85 ± 0.38 ^{a,A}	1.10 ± 0.29 ^{ab,B}	0.41 ± 0.05 ^{a,A}	0.70 ± 0.06 ^{ab,B}
F2	1	1.12 ± 0.15 ^{c,B}	1.93 ± 0.27 ^{ab,A}	0.48 ± 0.02 ^{ab,A}	0.92 ± 0.01 ^{a,A}
	28	1.43 ± 0.19 ^{bc,A}	1.12 ± 0.20 ^{ab,B}	0.40 ± 0.03 ^{a,B}	0.71 ± 0.09 ^{a,B}
F3	1	1.43 ± 0.10 ^{b,A}	1.91 ± 0.27 ^{ab,A}	0.43 ± 0.04 ^{b,A}	0.89 ± 0.02 ^{a,A}
	28	1.59 ± 0.18 ^{bc,A}	1.07 ± 0.12 ^{b,B}	0.39 ± 0.04 ^{a,A}	0.61 ± 0.06 ^{b,B}
F4	1	0.94 ± 0.10 ^{c,B}	1.63 ± 0.13 ^{b,A}	0.52 ± 0.05 ^{a,A}	0.94 ± 0.02 ^{a,A}
	28	1.28 ± 0.23 ^{c,A}	1.07 ± 0.15 ^{b,B}	0.40 ± 0.02 ^{a,B}	0.68 ± 0.04 ^{ab,B}
F5	1	1.53 ± 0.18 ^{b,c,B}	2.23 ± 0.29 ^{a,A}	0.47 ± 0.05 ^{ab,A}	0.87 ± 0.03 ^{a,A}
	28	1.80 ± 0.08 ^{b,A}	1.02 ± 0.26 ^{b,B}	0.41 ± 0.06 ^{a,B}	0.69 ± 0.07 ^{ab,B}
F6	1	0.95 ± 0.09 ^{c,B}	1.88 ± 0.17 ^{ab,A}	0.47 ± 0.03 ^{ab,A}	0.93 ± 0.02 ^{a,A}
	28	$1,25 \pm 0.13$ ^{c,A}	1.53 ± 0.25 ^{a,B}	0.46 ± 0.06 ^{a,A}	0.76 ± 0.07 ^{a,B}

a, b, c, d, e: Médias com letra minúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente entre si, entre formulações diferentes, para o mesmo dia de armazenamento ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey..

A, B, C, D, E: Médias com letra maiúscula sobrescrita comum na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para a mesma formulação ($p < 0.05$) de acordo com o Teste de Tukey.

*Formulações: F1: NaCl sem probióticos. F2: NaCl com probióticos. F3: NaCl/KCl (75:25 com probióticos). F4: NaCl/KCl (50:50 com probióticos). F5: NaCl/KCl/MgCl₂ (50:25:25 com probióticos). F6: NaCl:KCl:MgCl₂ (75:12,5:12,5 com probióticos)

**Valores em módulo.

3.4 Conclusões

Os resultados do presente trabalho confirmam a aptidão do queijo Cottage como matriz alimentícia para suplementação com bactérias probióticas com contagens suficientes para benefícios à saúde humana. Entretanto, a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* foi mais suscetível às condições de estresse como concentração de sal e temperatura de armazenamento, enquanto que o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* foi mais resistente a essas condições, apresentando maior viabilidade ao final do período de estocagem.

De modo geral não houve pós-acidificação durante o período de estocagem de 28 dias, pois em todas as formulações o pH final se apresentou ligeiramente superior ao pH inicial, exceto para a formulação F3, onde houve uma ligeira queda de pH ($p < 0,05$) entre o primeiro e o último dia de estocagem refrigerada. As formulações que apresentavam o sal $MgCl_2$ em sua composição foram as que apresentaram menores valores de pH. O ácido láctico foi o ácido orgânico mais encontrado em todas as formulações seguido pelo ácido cítrico e ácido acético.

A formulação controle F1 (sem probióticos e 100% de NaCl) foi a que apresentou menores índices de proteólise ao longo da estocagem ocorrendo diferença significativa ($p > 0,05$) da proteólise durante o tempo de armazenamento dessa formulação.

Apenas as formulações de queijo Cottage probiótico com 50% de redução de sódio podem ser rotulados como queijos com “reduzido teor de sódio”, segundo a legislação brasileira.

Os tratamentos dos queijos com sais hipossódicos e a adição de probióticos não promoveram diferenças significativas entre formulações ($p < 0,05$) para todos os ácidos graxos analisados.

Todos os queijos desse estudo podem ser classificados como baixo teor de gordura e muito alta umidade, segundo a legislação brasileira.

3.5 Referências Bibliográficas

AGARWAL, S., MCCOY, D., GRAVES, W., GERARD, P. D. & CLARK, S. Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and processed cheeses varies considerably in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1605–1615, 2011.

ALVARENGA, N. **Introdução da Tecnologia de Congelação na Produção de Queijo de Ovelha**. Dissertação de Doutorado, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, 164p, 2008.

ALVES, L. L., RICHARDS, N. S. P. S.; MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Inulin and probiotic concentration effects on fatty and linoleic conjugated acids in cream cheeses. **European Food Research & Technology**, (Print), p. 1-8, 2011.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of **Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. (method 952.06) Arlington: A.O.A.C. chapter 33. p. 5, 1995.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. Washington, 2006.

ARAÚJO, E. A.. **Desenvolvimento de queijo tipo cottage simbiótico e análise de sobrevivência do Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 em condições de simulação do trato gastro digestório**. MS Thesis, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2007.

ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S.; FURTADO, M.M.,MORAES, C.A. Produção de queijo Cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas em diferentes níveis de estresse. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, p. 111-118, 2009.

AYYASH, M.M. & SHAH, N.P. Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Halloumi Cheese during Storage: Chemical Composition, Lactic Bacterial Count, and Organic Acids Production. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 525-529, 2010.

AYYASH, M.M., SHERKAT, F., FRANCIS, P., WILLIAMS, R.P.W. & SHAH, N.P. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 37-42, 2011.

AYYASH, M. M., SHERKAT, F. & SHAH, N. P. The effect of NaCl substitution with KCl on Akawi cheese: Chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95. p. 47-59, 2012.

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

BARROS, C.M.V. **Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 211p, 2005.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S. F. Production of Cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, v. 79. p. 8-15, 1996.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-914, 1959.

BOUZAS, J.; KANT, C.A.; BODYFELT, F. TORES, J.A. Time and temperature influence on chemical again indicators for a commercial cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v.58, p.1307-1312, 1993.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 06 de dezembro de 2013.

BRASIL, 1998. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 1998. **Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar**. Disponível em: http://crn6.org.br/legislacao_alimentacao_e_nutricao/portaria. Acesso em 05 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.

Métodos Analíticos Oficiais Físico Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Acesso em 20 agosto 2013. <http://www.agricultura.gov.br>.

BRASIL, 2007. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 23, de 17 de abril de 2007. **Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança e eficácia do Ácido Linoléico Conjugado – CLA.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/23_190407.htm. Acesso em 16 de fevereiro de 2014.

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 54 de 13 de novembro de 2012. **Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2014.

BUGAUD, C.; BUCHIN, S.; NOE L, Y.; TEISSIER, L.; POCHET, S.; MARTIN, B. Relationships between Abundance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. **Lait**, v.81, p. 593–607, 2001.

BURITI, F. C. A; CARDARELLI, H. R; SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [online], v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

CHUNG, S. H., KIM, I. H., PARK, H. G., KANG, H. S., YOON, C. S., JEONG, H. Y., et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived *Bifidobacterium breve* LMC 017: Utilization as a functional starter culture for milk fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 3311–3316, 2008.

COAKLEY, M., ROSS, R. P., NORDGREEN, M., FITZGERALD, G., DEVERY, R., & STANTON, C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal Applied Microbiology**, v.94, p. 138–145, 2003.

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p.344-354, 2009.

CRUZ, A.G., R.S. CADENA, J.A.F. FARIA, H.M.A. BOLINI, C. DANTAS, M.M.C. FERREIRA, R. DELIZA. Adjustment for modeling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. **Food Research International**, v. 45, p. 211–5, 2012.

DONKOR, O.N., A. HENRIKSSON, T. VASILJEVIC AND N.P SHAH. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p. M375-M381, 2005.

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

GARCÍA, L. A; CARDADOR A; CAMPO, S. T. M; ARVÍZU, S. M; TOSTADO, E. C; GONZÁLEZ, C. R; ALMENDAREZ, B. G; LLANO, S. L. A. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, n.2, p. 191-197, 2013.

GEURTS TJ, WALSTRA P, MULDER H. Transport of salt and water during salting of cheese. 1. Analysis of the processes involved. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 28, p.102–29, 1974.

GOMES, A.M.P., TEIXEIRA, M.G. AND MALCATA, F.X. 'Viability of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus in Milk: Sodium Chloride Concentration and Storage Temperature'. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.22, p. 221-240, 1998.

GOMES, A. P., CRUZ, A. G., CADENA, R. S., CELEGHINI, R. M. S., FARIA, A. F., BOLONI, H. M. A., POLLONIO, M. A. R., GRANATO, D. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2701-2706, 2011.

GRANATO D., G.F. BRANCO, A.G. CRUZ, J.A.F. FARIA, AND F. NAZARRO. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292–302, 2010.

GUINEE, T.P. & FOX, P.F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In Fox, P.F. (3rd ed.), London: Chapman & Hall. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, v.1, p. 207-259, 2004.

GUINEE, T. P. Salting and the role of the salt in cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 99–109, 2004.

HORWITZ,W.;LATIMER JR.,G. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: **AOAC, Cap. 50, methods 985.35 e 984.27**, p.15-18, 2005.

KATSIARI, M.C., ALICHANIDIS, E., VOUTSINAS, L.P., ROUSSIS, I.G. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. **International Dairy Journal**, v.10, p. 635-646, 2000.

KATSIARI, M. C., VOUTSINAS, L. P., ALICHANIDIS, E., & ROUSSIS, I. G. Lipolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. **Food Chemistry**, v.72, p. 193–197, 2001.

KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. & ROUSSIS, I.G (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 465-472, 1997.

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

KISHINO, S., OGAWA, J., YOKOZEKI, K., & SHIMIZU, S. Microbial production of conjugated fatty acids. **Lipid Technology**, v. 21, p.177–181, 2009.

KIM, J. H.; KWON, O.; CHOI, N.; OH. S. J.; JEONGMAN-KANG, H.; JEONG, S. I.; KIM, Y. J. Variations in Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Processed Cheese by Lactation Time, Feeding Regimen, and Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3235–3239, 2009.

LIN, T. Y. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of different fatty acids. **Food Chemistry**, v. 94, p. 437–441, 2006.

LINDSAY, R.C., HARGETT, S.M., BUSH, C.S. Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p.360-370, 1982.

LUES, J.F.R.. Organic acid and residual sugar variation in a South African cheddar cheese and possible relationships with uniformity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.819-825, 2000.

LUNA, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheese protected with designation of origin. **Food Chemistry**, v. 103, p.1465-1472, 2007.

MASUDA, T.; YAMANARI, R.; ITOH, T. The trial for production of fresh cheese incorporated probiotic lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 167-171, 2005.

MELILLI C, BARBANO DM, LICITRA G, TUMINO G, FARINA G, CARPINO S. Influence of presalting and brine concentration on salt uptake by ragusano cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.4, p.1083–100, 2003.

MISTRY, V.V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 413-422, 2001.

MISTRY, V.V.; ANDERSON, D.L. Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. **Food Structure**, v. 12, p. 259–266, 1993.

O'CALLAGHAN, D.J., GUINEE, T.P. Rheology and Texture of Cheese. In Fox, P.F. (3rd ed.), **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, v. 1, p. 511-540. London: Chapman & Hall, 2004.

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 the proteolytic patterns and production of organic acid”. **International Dairy Journal**, v.16, p.446-456, 2006.

ONG, L.; SHAH, N.P. Influence of Probiotic Lactobacillus acidophilus and L. helveticus on Proteolysis, Organic Acid Profiles, and ACE-Inhibitory Activity of cheddar Cheeses Ripened at 4, 8, and 12 °C. **Journal of Food Science**, v. 73, p. M111-M120, 2008.

PARODIA, C.G. Desenvolvimento de Queijo Cottage Simbiótico. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RISÉRIUS, U., L. BERGLUND AND B. VESSBY. Conjugated Linoleic Acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the

metabolic syndrome: A randomized controlled trial. **International Journal of Obesity**,v.25, p.1129-1135, 2001.

RODRIGUES, F.C. **Lácteos especiais**. Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 151 p.,1999.

RODRIGUEZ-ALCALA, L. M., BRAGA, T., GOMES, A., MALCATA, F. X., & FONTECHA, J.Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and LAB by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. **Food Chemistry**, p. 125, p. 1373–1378, 2011.

R.T. MARSILI, H. OSTAPENKO, R.E. SIMMONS, and D.E. GREEN. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p. 52-57,1981.

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

SIEBER, R.; COLLOMB, M.; AESCHLIMANN, P.; JELEN, H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. **International Dairy Journal** , v.14, p. 1-15, 2004.

SILVESTRE, M. P. C.; LOPES, D. C. F.; SILVA, M. R.; SILVA, V. D. M. Availability of Food Sources of Conjugated Linoleic Acid in Brazil. **Pakistan Journal of Nutrition**,v.12, n.1, p. 08-11, 2013.

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

SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling historical and scientific perspectives. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.8, p.54-57, 1998.

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

UPADHYAY, V. K.; MCSWEENEY, P. L. H.; MAGBOL, A. A. A.; FOX, P. F. Proteolysis in cheese during ripening. In: FOX P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.;

COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 617 p., 2004.

VAN NIEUWENHOVE, C. P.; OLISZEWSKIA, R.; GONZÁLEZA, N; S.; CHAIA, A. B. P. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. **Food Research International**, v.40, p. 559-564, 2007.

WILKINSON, M.G.; MEEHAN, H.; STANTON, C.; COWAN, C. “Marketing cheese with a nutrient message”. **Bulletin IDF**, v.363, p.39-45, 2001.

YAQOOB, P.; TRICON, S. Conjugated linoleic acids (CLAs) and health. In C. Williams, & J. Buttriss (Eds.), **Improving fat content of foods** (pp. 182–212). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limiting, 2006.

ZOCK, P. L. Health problems associated with saturated and trans fatty acids intake. In C. Williams, & J. Buttriss (Eds.), Part 1. **Dietary fat and health. Improving fat content of foods**, p. 3–24. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limiting, 2006.

Conclusões Gerais

O queijo tipo Cottage probiótico produzido nesse estudo apresentou quantidades adequadas de células probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, em níveis suficiente para exercer efeitos benéficos ao consumidor. Entretanto, pôde-se observar que cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* foi mais suscetível às condições de estresse como concentração de sal e temperatura de armazenamento, enquanto que o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* foi mais resistente a essas condições, apresentando maior viabilidade ao final do período de estocagem.

A metodologia de estimativa de magnitude se mostrou eficaz na substituição parcial de NaCl por sais hipossódicos em queijo Cottage probiótico, representando uma alternativa em relação as metodologias tradicionais de substituição de NaCl.

A textura dos queijos Cottage se mostrou como um atributo essencial para uma boa aceitação do produto.

A redução na quantidade de sal em até 25% (p/p) apresentou uma boa aceitação pelo consumidor, sendo que adição de sais hipossódicos se mostrou eficiente na substituição parcial, pois o poder de salga dos sais hipossódicos utilizados não foi alterado em relação ao do NaCl nesse tipo de queijo, sendo uma excelente alternativa para dietas com restrição de sódio.

O queijo tipo Cottage probiótico produzido nesse estudo apresentou características promissoras como alimento funcional e com boas perspectivas para comercialização.

Sugestões para Trabalhos Futuros

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho, assim como o conhecimento adquirido no desenvolvimento do estudo, pode-se sugerir os seguintes trabalhos a serem desenvolvidos:

- Realizar um estudo a fim de se verificar a viabilidade dos probióticos quando expostos às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal.

- Caracterização microbiológica dos queijos Cottage obtidos nesse estudo a fim de se verificar se estão em conformidade com a legislação brasileira para queijos de muito alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundantes (umidade > 55%). De acordo com a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

- Realizar Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) para se estabelecer o perfil descritivo sensorial das diferentes amostras de queijo Cottage e assim estabelecer os direcionadores de preferência para esse tipo de queijo.

- Realizar um estudo a fim de se verificar se a produção de ácidos orgânicos ou bacteriocinas associados com bactérias lácticas (BAL) e *Lactococcus lactis* podem impactar negativamente o crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Cottage probiótico reduzido de sódio.

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO:

REDUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO EM QUEIJO COTTAGE PROBIÓTICO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E ACEITAÇÃO SENSORIAL

RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA E PELA APRESENTAÇÃO DO TCLE

Ana Laura Tibério de Jesus e José de Assis Fonseca Faria

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os consumidores têm buscado cada vez mais alimentos que contribuam para sua saúde, o que, aliado à grande oferta de produtos no mercado, leva ao aumento no consumo de micro-organismos probióticos. Estes podem ser aplicados em diferentes alimentos como, por exemplo, em queijos, o que representaria uma alternativa adequada para atender tais necessidades. Da mesma forma, o consumo de alimentos que apresentem reduzido teor de sódio contribuiria para a redução do risco de uma série de doenças, reforçando o conceito de alimentos com apelo saudável, buscado pelo consumidor. Neste projeto será avaliada a estabilidade de um queijo tipo cottage, adicionado dos micro-organismos probióticos *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, além da cultura starter *Lactococcus lactis*, assim como será avaliada a influência da redução do teor de sódio, através da substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio e cloreto de magnésio neste produto. O objetivo será avaliar a aceitação sensorial do queijo cottage probiótico com reduzido teor de sódio além de levantar dados sobre a dieta dos participantes da pesquisa.

PROCEDIMENTO

Será avaliada a aceitação de amostras de queijo cottage acrescidas de micro-organismos probióticos e com reduzido teor de sódio, juntamente com outros 2 outros produtos comerciais, utilizando uma escala de 9 pontos (variando de 1 = desgostei extremamente, a 9 = gostei extremamente). Serão atribuídas notas para aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. Na mesma ficha de avaliação será perguntada a intenção de compra do produto (se compraria ou não). Além desta ficha o participante receberá um questionário levantando informações a respeito do consumo de sódio e de sua dieta.

DESCONFORTOS E RISCOS PREVISÍVEIS

Não há riscos previsíveis para quem for participar da pesquisa, a menos que o voluntário possua algum tipo de alergia a derivados lácteos, ao aditivo sorbato de potássio, aos sais utilizados, ou ainda intolerância aos micro-organismos descritos. Os benefícios principais seriam decorrentes da redução dos níveis de sódio na dieta, o que auxiliaria a manutenção da pressão arterial em níveis adequados (efeito benéfico cardiovascular).

Os voluntários terão garantia de sigilo durante toda a pesquisa e poderão deixar de participar dos testes sensoriais a qualquer momento, não havendo ônus ao voluntário.

O pesquisador estará disponível para quaisquer questionamentos, dúvidas ou esclarecimentos sobre a pesquisa, que porventura venham a ser solicitados pelo participante, através do contato:

Tel.: (19) 3521-4019

e-mail: analaura@fea.unicamp.br

Quaisquer denúncias ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa podem ser encaminhadas para:

Comitê de Ética em Pesquisa/ FCM/ Unicamp:

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Caixa Postal: 6111 13083-887 Campinas – SP

Fone: (19) 3521-8936 Fax: (19) 3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Número do Parecer: 184.846

Data da Relatoria: 05/12/2012

Data: ___ / ___ / ___

Assinatura do responsável pela pesquisa:

Assinatura do provador:

Anexo B: Ficha do Teste de Consumidor

Nome: _____ Idade: _____

1) De modo geral, por favor indique o quanto você gostou ou desgostou, utilizando a escala hedônica abaixo.

-
- 9 - Gostei extremamente (Adorei)
 - 8 - Gostei muito
 - 7 - Gostei moderadamente
 - 6 - Gostei ligeiramente
 - 5 - Nem gostei/Nem desgostei
 - 4 - Desgostei ligeiramente
 - 3 - Desgostei moderadamente
 - 2 - Desgostei muito
 - 1 - Desgostei extremamente (Detestei)
-

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global

2) Para os atributos de **gosto salgado, gosto ácido e textura**, utilizem escala abaixo indicando a intensidade de cada um dos respectivos atributos para cada uma das amostras em relação a uma intensidade ideal. **Favor anotar o número da amostra e responder às perguntas:**

- 9 – extremamente mais que o ideal
- 8 – muito mais que o ideal
- 7 – moderadamente mais que o ideal
- 6 – ligeiramente mais que o ideal
- 5 – ideal
- 4 – ligeiramente menos que o ideal
- 3 – moderadamente menos que o ideal
- 2 – muito menos que o ideal
- 1 – extremamente menos que o ideal

Amostra	Gosto salgado	Gosto Ácido	Textura

3) Para cada amostra, **indique características positivas (que você mais gostou) e características negativas (que você menos gostou)**. Por favor, seja o mais específico possível e evite termos afetivos (gostoso, saboroso, macio, entre outros) **É obrigatório mencionar, pelo menos, uma característica de cada tipo.**

Amostra	Características positivas	Características negativas

4) Você compraria este produto?

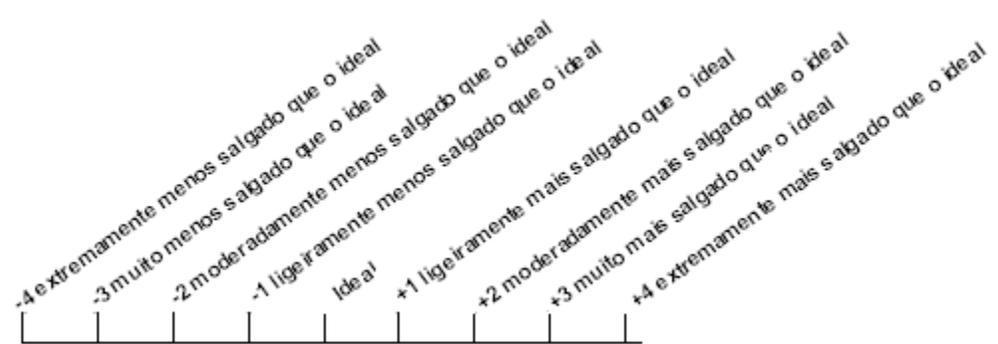
Amostra	SIM	NÃO

Anexo C: Ficha do Teste Escala do Ideal

Nome: _____ Data: __/__/__

Você está recebendo 5 amostras codificadas de queijo cottage probiótico. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e faça um traço vertical no local da escala que melhor representa o quão ideal está o gosto salgado de cada amostra. **Você pode marcar um traço em qualquer lugar da escala.**

Amostra: _____



Comentários: _____
