



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATRI GASPARIN

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS CURADO
COM ADIÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* EF 1,
LACTOBACILLUS HELVETICUS LH 13 E EXTRATO DE
CÚRCUMA (*CURCUMA LONGA* L.)**

KATRI GASPARIN

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS CURADO
COM ADIÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* EF 1,
LACTOBACILLUS HELVETICUS LH 13 E EXTRATO DE
CÚRCUMA (*CURCUMA LONGA* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gasparin, Katri .

Desenvolvimento de queijo minas curado com adição de *Enterococcus faecium* EF 1, *Lactobacillus Helveticus* LH 13 e extrato de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) / Katri Gasparin. - Londrina, 2015.

79 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Proteólise - Teses. 2. Curcumina - Teses. 3. Atividade antioxidante - Teses. 4. Desempenho sensorial - Teses. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

KATRI GASPARIN

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS CURADO
COM ADIÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* EF 1,
LACTOBACILLUS HELVETICUS LH 13 E EXTRATO DE
CÚRCUMA (*CURCUMA LONGA* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Prof. Dr. Gilberto Alves
Universidade Paranaense – UNIPAR

Londrina, 30 de novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido força de vontade e coragem para enfrentar os desafios.

À professora Dra. Sandra Garcia, pela sua orientação e paciência. Obrigada pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Sacco-Brasil pelo fornecimento das culturas lácticas.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo fornecimento dos laboratórios.

A Fazenda Escola da UEL pelo fornecimento de leite e empréstimo de equipamentos.

A mi novio Sebastián de Jesús Manrique Machado, que siempre me apoyó y confió en mi potencial.

Às grandes amigas Sabrina Penteado e Talita Kato pela amizade e companheirismo.

À estagiária Carolina Saori Yamashita por toda a dedicação, presteza e pela companhia constante durante a semana, finais de semana e feriados, tornando os dias de trabalho mais leves.

À professora Dra. Marly Sayuri Katsuda pelo gentil fornecimento de materiais e pela disposição em ajudar.

Ao Dr. Múcio Mansur Furtado, pelo gentil fornecimento de seus livros e pelas dicas valiosas que contribuíram muito no desenvolvimento desse trabalho.

À professora Dra. Thaís de Souza Rocha pelos ensinamentos.

À Vitória Figueiredo pela assistência na análise eletroforética.

Aos colegas Alessandra Bosso, Adriana Bosso, André Mori, Bruna Yumi Yoshida, Carolina Saori, Dirlei Kieling, Karla Guergoletto, Lucas Caldeirão, Marli Busanello Niedermeyer, Marsilvio Filho, Naiara Ramos, Natália Har Niguma, Paulo Barbett, Paulo Saito e Rodrigo Diorio, pelo convívio harmonioso.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Neusa C. dos Santos, Alessandra Cristina Silva e Rubens Borges Santos.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Martin Luther King

GASPARIN, Katri. **Desenvolvimento de queijo Minas Curado com adição de *Enterococcus faecium* EF 1, *Lactobacillus helveticus* LH 13 e extrato de cúrcuma (*Curcuma longa* L.).** 2015. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Durante a maturação do queijo, ocorrem diversas reações de degradação, ocasionadas por enzimas provenientes do leite, do coalho e de culturas microbianas, que causam mudanças sensoriais essenciais. A aplicação de culturas proteolíticas selecionadas pode fazer com que o processo de maturação seja acelerado e, assim, desenvolva mais rapidamente as características de sabor, aroma e textura. Os probióticos são microrganismos que quando consumidos numa concentração 10⁸ UFC a 10⁹ UFC na porção diária promovem benefícios ao organismo. A cúrcuma, por apresentar pigmentos fenólicos responsáveis pela cor amarela, pode ser aplicada em alimentos com o intuito de aumentar a atividade antioxidante do produto. Desse modo, visando a melhora tecnológica, sensorial e nutricional, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma em queijo Minas Curado por até 60 dias. Foram realizados três tratamentos: queijo com adição de apenas cultura *starter* (Controle), queijo adicionado de *E. faecium* e *L. helveticus* (T1); e queijo adicionado de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma (T2). Durante a maturação, foram realizadas análises da composição centesimal, pH, acidez titulável, contagens microbiológicas de células viáveis, teor de curcumina, fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH·, ABTS+· e FRAP), índice de extensão e de profundidade de proteólise, separação de polipeptídeos por massa molecular utilizando SDS-PAGE e análise sensorial. Os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao teor de sal e umidade ($p > 0,05$). O teor de cinzas apresentou valor significativamente menor no tratamento T2 ($p \leq 0,05$). Os tratamentos apresentaram queda nos valores de pH durante a maturação, atingindo 4,7 a 4,8 a partir de 14 dias. A acidez titulável apresentou aumento progressivo durante a maturação para os três tratamentos, alcançando até 1,3 g ácido láctico.100 g⁻¹ de queijo. Os queijos apresentaram contagens de *E. faecium* entre 7 e 8 log UFC.g⁻¹ durante todo o período de maturação, atendendo à legislação. Em relação ao conteúdo de fenólicos totais, os queijos T2 apresentaram 174,29 ± 0,46 mg EAG.100 g⁻¹, aumento significativo ($p \leq 0,05$) quando comparado aos outros tratamentos. O tratamento T2 apresentou um aumento no teor de curcumina durante a maturação, atingindo 0,01 ± 0,00 g.100 g⁻¹ a partir de 45 dias. Quanto à atividade antioxidante, o tratamento T2 apresentou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) de compostos fenólicos, influenciando no aumento da atividade antioxidante. O índice de extensão de proteólise dos três tratamentos foi de 12 % aos 60 dias. O índice de profundidade apresentou valores de 7,78 % para o tratamento T1 e 6,78 % para os tratamentos T1 e T2 aos 60 dias, ou seja, a adição de *E. faecium* e *L. helveticus* não promoveu aumento da taxa de proteólise dos queijos até o período estudado. Os perfis eletroforéticos por SDS-PAGE dos três tratamentos, após 30 dias, apresentaram similaridades. Por fim, no teste de aceitação sensorial, os tratamentos Controle e T1 apresentaram notas de aceitação global entre 7 e 8, e o tratamento T2 entre 6 e 7. Concluiu-se que os queijos probióticos adicionados de extrato de cúrcuma apresentaram propriedades microbiológicas e nutritivas adequadas, com boa aceitação sensorial.

Palavras-chave: Proteólise. Curcumina. Atividade antioxidante. Desempenho sensorial. SDS-PAGE.

Gasparin, Katri. **Development of Minas cheese ripened with the addition of *Enterococcus faecium* EF 1, *Lactobacillus helveticus* LH 13 and turmeric extract (*Curcuma longa* L.)** . 2015. 79p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

During cheese ripening, several hydrolysis reactions occur, caused by enzymes originating from the milk, rennet and the bacterial cultures, which cause essential sensory changes. The application of proteolytic selected cultures can cause the acceleration of maturation process and thus develop more rapidly the characteristics of flavor, aroma and texture. Probiotics are microorganisms that when consumed in a concentration 10⁸ CFU a 10⁹ CFU on daily serving promote benefits to the body. Turmeric, presenting phenolic pigments responsible for the yellow color may be applied in foods with the purpose of increasing the antioxidant activity of the product. Thus, aiming at technological, sensory and nutritional improvement, this study evaluated the effects of the addition of *E. faecium*, *L. helveticus* and turmeric extract in Minas cheese matured for 60 days. Three treatments were performed: cheese with only addition of starter culture (Control), cheese added *E. faecium* and *L. helveticus* (T1); cheese added *E. faecium*, *L. helveticus* and turmeric extract (T2). During maturation, analyzes were conducted on the chemical composition, pH, titratable acidity, microbiological counts of viable cells, curcumin content, total phenolics, antioxidant activity (DPPH•, ABTS+• and FRAP), extension and depth of proteolysis, polypeptides separation by molecular weight using SDS-PAGE and sensory analysis. The treatments showed no statistical differences in salt and moisture content ($p > 0.05$). The ash content was significantly lower in the treatment T3 ($p \leq 0.05$). Treatments presented a decay in pH during maturation, average values of 4.7 to 4.8 after 14 days. The acidity was progressively increased during maturation for all three treatments, reaching up to 1.3 g lactic acid .100 g⁻¹ of cheese. The cheeses presented *E. faecium* counts between 7 and 8 log CFU.g⁻¹ of cheese during the maturation period, in compliance with brazilian legislation. Regarding the content of total phenolics, T2 cheese showed 174.29 ± 0.46 mg EAG.100 g⁻¹, a significant increase ($p \leq 0.05$) when compared to other treatments. T2 treatment showed an increase in curcumin during maturation, reaching 0.01 ± 0.00 g.100 g⁻¹ from 45 days. As for antioxidant activity, the T2 treatment showed a significant ($p \leq 0.05$) difference of phenolic compounds, influencing the increased antioxidant activity. The proteolysis extension rate of three treatments was 12 % after 60 days. Index of depth of proteolysis index showed values of 7.78 % for the Control treatment and 6.78 % for T1 and T2 at 60 days, showing that the addition of *E. faecium* and *L. helveticus* did not promote increased proteolysis rate in cheese during the study period. The electrophoretic profiles by SDS-PAGE of the three treatments, after 30 days, showed similarities. Finally, in the sensory acceptance test, Control and T1 showed global acceptability between 7 and 8, and T2 treatment between 6 and 7. It was concluded that the cheeses made adding ground turmeric exhibited microbiological and adequate nutritional properties, with good sensory acceptance.

Keywords: Proteolysis. Curcumin. Antioxidant activity. Sensory performance. SDSPAGE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Consumo per capita de queijos no Brasil (em quilos)	18
Figura 2 - Produção total de queijos no Brasil (em mil toneladas)	19
Figura 3 - Planta de <i>Curcuma longa</i> L. e rizoma moído	28
Figura 4 - Fluxograma de produção do queijo Minas Curado	33
Figura 5 - Contagem de bactérias lácticas totais dos queijos Controle, contagens de células viáveis <i>E. faecium</i> e bactérias lácticas totais em amostras de T1 e T2 com 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação	47
Figura 6 - Variação do índice de extensão da proteólise de queijo Minas Curado com até 60 dias de maturação do Controle e dos tratamentos T1 e T2	55
Figura 7 - Variação do índice de profundidade da proteólise de queijo Minas Curado até 60 dias de maturação dos tratamentos Controle, T1 e T2	56
Figura 8- Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do Controle (C) e dos tratamentos T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação	57
Figura 9 - Porcentagem de julgadores para aceitação de queijo adicionado de <i>E. faecium</i> e <i>L. helveticus</i> adicionado de extrato de cúrcuma (T2), por meio de teste sensorial de aceitação com escala hedônica de 9 pontos	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros físico-químicos de queijo Minas Curado maturado no mínimo 20 dias	19
Tabela 2 -	Identificação de peptídeos biologicamente ativos e ocorrência em diversos produtos lácteos utilizando linhagens de <i>L. helveticus</i>	25
Tabela 3 -	Tratamentos distintos envolvendo a produção de queijo Minas Curado	32
Tabela 4 -	Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado tipo A utilizado para a produção dos queijos Controle (Lote 1) e do leite utilizado para a produção dos queijos T1 e T2 (Lote 2).....	42
Tabela 5 –	Valores do rendimento previsto, a partir do modelo polinomial do 2º grau proposto e cálculo do erro relativo médio	43
Tabela 6 -	Médias e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos, determinados nas amostras Controle, T1 e T2 de queijos Minas Curado, no período de maturação de 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias	45
Tabela 7 -	Valores de pH e acidez titulável do Controle e dos tratamentos T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30, 45 e 60 dias de maturação	50
Tabela 8 -	Concentração de curcumina na cúrcuma moída comercial e no tratamento T2 com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação	51
Tabela 9 -	Componentes L*, a* e b*, para o Controle, T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação	52
Tabela 10 -	Valores para compostos fenólicos e capacidade antioxidante por DPPH+, ABTS+. e FRAP, da cúrcuma moída e do Controle, T1 e T2 com 0 (dia após a produção), 14, 30, 45 e 60 dias de maturação	54
Tabela 11 -	Escores de avaliação sensorial do Controle e dos tratamentos T1 e T2, para os atributos aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global, com 20 dias de maturação	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	PROTEÍNAS DO LEITE	16
3.2	ASPECTOS TECNOLÓGICOS DA PRODUÇÃO DE QUEIJO	17
3.3	<i>Lactobacillus helveticus</i>	22
3.4	<i>Enterococcus faecium</i>	26
3.5	<i>Curcuma longa L.</i>	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAIS	30
4.2	MÉTODOS	30
4.2.1	Caracterização Físico-Química e Microbiológica do Leite Pasteurizado	30
4.2.2	Preparo dos Inóculos	31
4.2.3	Produção do Extrato de Cúrcuma	31
4.2.4	Produção do Queijo Minas Curado	32
4.2.5	Preparo das amostras para análise	34
4.2.6	Avaliação da Composição Centesimal dos Queijos	34
4.2.7	Análise Microbiológica dos Queijos	35
4.2.8	Determinação do pH e Acidez Titulável	35
4.2.9	Determinação do teor de curcumina por método colorimétrico	36
4.2.10	Cor	36
4.2.11	Determinação de Fenólicos Totais	37
4.2.12	Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH	37
4.2.13	Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais ABTS+.....	38

4.2.14	Determinação do poder redutor: Capacidade de Redução do Ferro – FRAP	38
4.2.15	Índice de Extensão e de Profundidade da Proteólise	39
4.2.16	Perfil de massa molecular de peptídeos pelo método eletroforético SDS-PAGE	39
4.2.17	Análise das Condições Higiênico-Sanitárias	40
4.2.18	Análise Sensorial	40
4.2.18.1	Condições do teste e preparo das amostras	40
4.2.18.2	Teste de aceitação de atributos	41
4.2.19	Análise Estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	42
5.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS QUEIJOS	43
5.2	CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS, pH E ACIDEZ TITULÁVEL	46
5.3	TEOR DE CURCUMINA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO	51
5.4	COR	52
5.5	COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	53
5.6	EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE	54
5.6.1	Índice de Extensão e Profundidade da Proteólise	54
5.5.2	Perfil eletroforético por SDS-PAGE	57
5.7	CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E ANÁLISE SENSORIAL	59
6	CONCLUSÃO	62
	BIBLIOGRAFIA	63
	ANEXOS	73
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – UEL	73
	ANEXO B - Modelo de ficha para a coleta de dados do provador	75

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na forma de convite para produto funcional na análise de aceitação.....	76
ANEXO D - Modelo de ficha para o teste de aceitação dos atributos sensoriais estruturados em escala hedônica de 9 pontos.....	78
ANEXO E – Página de acesso do <i>Curriculum lattes</i> dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.....	79

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos saudáveis está estimulando a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos em todo o mundo. Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo poderá afetar benéficamente uma ou mais funções fisiológicas alvo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

O queijo é um concentrado protéico-gorduroso resultante da coagulação do leite, que por apresentar uma quantidade de gordura relativamente alta, oferece uma proteção para a bactéria probiótica durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Alguns queijos apresentam alta atividade de água, baixos teores de sal e ausência de agentes conservantes, oferecendo excelentes condições para a sobrevivência e crescimento de linhagens probióticas (GARDINER et al., 1998).

A microbiota intestinal humana exerce um papel importante na saúde e a suplementação da dieta com probióticos pode assegurar o equilíbrio intestinal, impedindo que microrganismos potencialmente patogênicos, nela presente, exerçam efeitos negativos (ZIEMER, GIBSON, 1998; SAAD, 2006). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 02 de janeiro de 2002, probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Os benefícios associados, uma vez consumidos regularmente, são: competição com patógenos por nutrientes; adesão e colonização da superfície da mucosa intestinal; redução de episódios de diarreia; alívio da constipação; estimulação do sistema imune; diminuição do risco de doença cardiovascular; redução dos níveis séricos de colesterol e efeitos anti-hipertensivos (AHN et al., 2003; GUEIMONDE et al., 2006; SAZAWAL et al., 2006; ROSELINO et al., 2012; CELIBERTO, 2014).

Os produtos probióticos comercializados geralmente contêm quantidades maiores ou iguais a 10^6 UFC por 100 g de produto (ROSELINO, 2012). Charteris et al. (1998) sugerem que a contagem de probióticos deve alcançar

10^9 a 10^{10} UFC.100 g⁻¹ ou 100 mL de produto para que a quantidade no intestino do consumidor atinja 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹. A ANVISA, RDC nº 18 de julho de 2008 (BRASIL, 2008), recomenda que a quantidade mínima viável deve ser de 10^8 a 10^9 UFC, na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, sendo que valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

Segundo a legislação (BRASIL, 2008), é permitido o uso da alegação “O (indicar a espécie do microrganismo probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, para produtos que contenham os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. casei subsp. defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, *B. lactis*, *B. longum* e *Enterococcus faecium*.

Também muito utilizado como cultura *starter* e cultura adjunta na produção de queijos europeus tradicionais, *E. faecium*, através de sua atividade proteolítica, contribui para a aceleração da maturação e na produção de compostos aromáticos, melhorando sensorialmente queijos maturados (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Lactobacillus helveticus é um microrganismo proteolítico muito utilizado na produção de queijos maturados de longa duração, como o Parmesão (FURTADO, 2011). O seu sistema proteolítico consiste em proteinases do envelope celular (CEP), que degradam as proteínas à oligopeptídeos, sendo subsequentemente absorvidos pelas células através de sistemas de transporte específicos para posterior degradação em peptídeos menores ou aminoácidos, por ação de várias peptidases intracelulares. Essa hidrólise da caseína em peptídeos e aminoácidos livres é importante no processo de cura de queijos, e *L. helveticus* tem demonstrado contribuição na aceleração da maturação e na redução do amargor de queijos maturados (SAHINGIL et al., 2014).

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.), muito utilizada como corante e condimento, contém pigmentos fenólicos responsáveis pela cor amarela, chamados de pigmentos curcuminóides ou curcumina, que apresentam várias propriedades benéficas, como atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, reguladora das funções biliares e redutoras dos níveis de colesterol.

Deste modo o presente trabalho propôs desenvolver um queijo Minas Curado por até 60 dias, adicionado de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma, e avaliar o desenvolvimento da proteólise, através do perfil molecular dos polipeptídeos presentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Minas Curado por até 60 dias adicionado de *Enterococcus faecium* EF 1, *Lactobacillus helveticus* LH 13 e extrato de cúrcuma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros físico-químicos dos queijos durante a maturação, nos diferentes tratamentos;
- Avaliar a viabilidade de *E. faecium* durante o período de maturação dos queijos;
- Avaliar a atividade antioxidante e o teor de curcumina nos queijos adicionados de extrato de cúrcuma;
- Analisar a evolução da proteólise, através da massa molecular de polipeptídeos produzidos;
- Avaliar o desempenho sensorial do produto final com adição de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma, comparado ao queijo adicionado apenas de cultura *starter*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROTEÍNAS DO LEITE

O leite contém entre 30 a 36 g/L de proteínas totais, as quais pertencem a duas categorias principais que podem ser separadas com base na sua solubilidade em pH 4,6 a 20 °C. As que precipitam nessas condições são conhecidas como caseínas e as que se mantêm solúveis são as proteínas do soro (FOX et al., 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

As caseínas são designadas como α_{S1} , α_{S2} , β e κ -caseína, moléculas pequenas com massa molecular variando entre 19 - 25 kDa e apresentam interações específicas com íons e sais de cálcio, devido às regiões com grupos fosfatos (FOX et al., 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). A α_{S2} -caseína contém três regiões com esses grupos e, devido a isso, é a mais sensível ao cálcio, precipitando em meio com concentrações de 2 mM Ca^{2+} . As α_{S1} - e β -caseínas requerem 6 mM Ca^{2+} para a precipitação. A κ -caseína, por se ligar fracamente ao Ca^{2+} , devido ao seu único resíduo fosforilado, não é precipitada e se mantém estável na presença deles (FARRELL et al., 2004; LUQUET, 1991).

Os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos (polares e carregados) não são uniformemente distribuídos nas moléculas de caseínas, mas proporcionam estruturas fortemente anfipáticas que as tornam altamente ativas na superfície e insolúveis em água. Apesar disso, são relativamente hidrofóbicos, o que explica o porquê de seus peptídeos hidrolisados terem uma alta propensão ao amargor, o que é considerado um defeito em variedades de queijos (FOX et al., 2000; KRUIF et al., 2012).

Devido aos grupos fosfatos e a estrutura anfipática, as caseínas unem-se entre si e ao fosfato de cálcio, formando um complexo esférico muito hidratado, chamado de micela de caseína, com diâmetro entre 90 a 300 nm, composto de fosfato de cálcio, Mg^{2+} e citratos (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Além disso, acredita-se que as micelas são formadas por submicelas, com diâmetros de 15 a 20 nm, unidas entre si por interações hidrofóbicas (LUQUET, 1991).

A estrutura da micela é composta por κ -caseína na superfície e as α_S - e β -caseínas no interior, devido à sensibilidade ao cálcio. Porém a distribuição não é exclusiva, pois as caseínas sensíveis ao cálcio também são acessíveis na superfície. As κ -caseínas interagem com as α_{S1} -, α_{S2} - e β -caseínas, estabilizando-as na presença de Ca^{2+} e tornando a estrutura da micela anfipática, com um domínio polar inerte que não é precipitado pelo Ca^{2+} . A região N-terminal hidrofóbica da κ -caseína é a que mais interage hidrofobicamente com as caseínas sensíveis ao cálcio. A extremidade C-terminal hidrofílica, que contém oligossacarídeos (galactose, galactosamina e ácido N-acetilneurâmico) que aumentam a hidrofiliidade, sobressai na superfície, proporcionando um aspecto de fios à micela (FOX et al., 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; GRIFFITHS, TELLEZ, 2013).

As proteínas do soro são designadas como β -lactoglobulinas e α -lactoalbuminas. Possuem distribuição uniforme de resíduos hidrofóbicos, polares e carregados, ao contrário do que acontece com as caseínas, e devido a isso, dobram-se intramolecularmente, ocultando a maioria dos resíduos hidrofóbicos e evitando a interação com outras proteínas (FARRELL et al., 2004; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

As proteínas restantes, albumina sérica e imunoglobulinas são derivadas do sangue, e as γ -caseínas e as proteose-peptonas são resultantes da proteólise limitada de β -caseína, nas extremidades C-terminal e N-terminal, respectivamente, ocasionada pela enzima plasmina, derivada do sangue e que está naturalmente presente em leite (FARRELL et al., 2004). Segundo Sousa, Ardo e McSweeney (2001), as frações γ -caseínas (γ_1 , γ_2 e γ_3) são resultado da pasteurização que ativa o plasminogênio, levando à maior atividade da plasmina sobre a extremidade C-terminal da β -caseína, nas ligações Lis28-Lis29, Lis105-His106 e Lis107-Glu108, produzindo fragmentos designados como γ_1 -caseína (f 29-209), γ_2 -caseína (f 106-209) e γ_3 -caseínas (f 108-209).

3.2 ASPECTOS TECNOLÓGICOS DA PRODUÇÃO DE QUEIJO

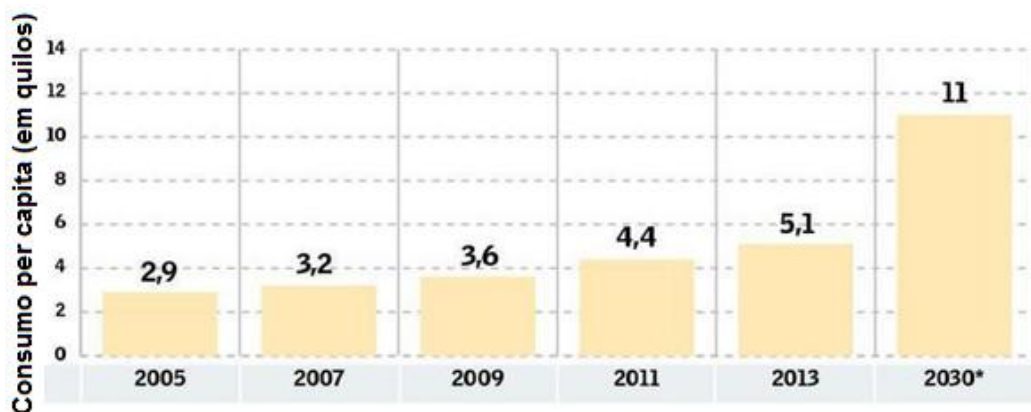
Segundo a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1996),

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Queijo maturado é aquele que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo - ABIQ (VALOR ECONÔMICO, 2014), 11 bilhões de litros de leite produzidos no Brasil são destinados à fabricação de queijo, o que corresponde a 32 % do total produzido. Segundo estimativas da ABIQ, o consumo per capita de queijos no Brasil (Figura 1), que em 2013 foi de 5,1 quilos, deverá alcançar, em média, 11 quilos em 2030, em torno de 116 % a mais comparado a 2013, justificado pelo aumento da renda populacional e mudanças nos hábitos alimentares. Apesar da estimativa, o Brasil ainda está muito atrás de outros países, como a vizinha Argentina, que em 2013 alcançou 11 quilos per capita, e a Europa 20 quilos per capita em média.

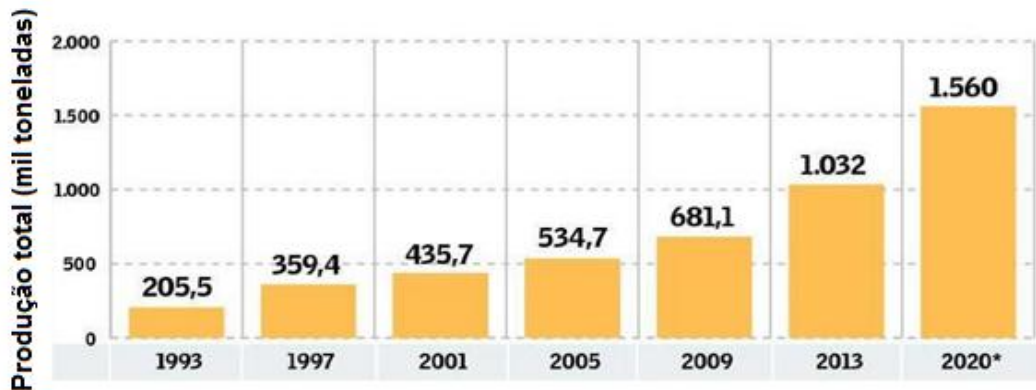
Em 2013, a produção total de queijos no Brasil atingiu 1.032 mil toneladas e até 2020 deverá alcançar 1,56 milhões de toneladas de queijo (Figura 2) (VALOR ECONÔMICO, 2014). Segundo a *Transparency Market Research* (MILKPOINT, 2014), a produção só não será maior devido à natureza perecível do produto e as rígidas regulamentações do governo.

Figura 1 - Consumo per capita de queijos no Brasil (em quilos)



Fonte: ABIQ (VALOR ECONÔMICO, 2014)

Figura 2 - Produção total de queijos no Brasil (em mil toneladas)



Fonte: ABIQ (VALOR ECONÔMICO, 2014)

Segundo Furtado (2005), o queijo Minas Curado, também denominado por Minas Padrão ou Minas Prensado é, possivelmente, um dos primeiros queijos produzidos industrialmente no país. É um queijo maturado por no mínimo 20 dias; de massa crua; semi-dura; prensado; textura aberta; com abundância de olhaduras mecânicas; sem gás; cor branco amarelado; com sabor ligeiramente ácido e aroma suave; com vida útil em torno de 2 a 3 meses; com riscos de apresentar sabor amargo. Sua forma mais comum é a cilíndrica achatada, com diâmetros de 12 a 14 cm e peso variando entre 0,5 e 1,2 kg. Contudo, suas características físico-químicas e sensoriais não são padronizadas, devido à ausência de regulamento técnico de identidade e qualidade do produto (MARQUES et al., 2011).

A Tabela 1 demonstra a composição média de queijo Minas Curado maturado no mínimo 20 dias, segundo Furtado (2005).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de queijo Minas Curado maturado no mínimo 20 dias

Parâmetros	g.100 g ⁻¹ de queijo
Umidade	46 - 49
Extrato Seco Total (EST)	51 - 54
Gordura	23 - 25
Gordura no Extrato Seco (GES)	43 - 49
Cloreto de sódio	1,4 - 1,6
pH	5,0 - 5,1

Fonte: *Quesos típicos de Latinoamérica* – Furtado (2005)

Durante a maturação do queijo, ocorrem muitas transformações bioquímicas, físico-químicas e microbiológicas que conduzem a mudanças fundamentais em sua estrutura. A proteólise modifica a consistência e a textura do queijo, reduz o amargor e contribui para o *flavour* (KANAWJIA et al., 1995; CANDIOTI et al., 2002; FURTADO, 2011). Muitas enzimas são responsáveis pela proteólise do queijo: a plasmina (provenientes do leite); os resíduos de quimosina e as enzimas endógenas e exógenas de microrganismos adicionados ou de possíveis contaminantes.

Existem diversas enzimas naturalmente presentes no leite, no entanto a atividade proteolítica endógena principal é decorrente da ação da plasmina. Esta enzima possui atividade ótima em pH 7,5 - 8,0 e temperatura de 37 °C, porém apresenta estabilidade em um intervalo de pH 4 a pH 9. Apresenta resistência à pasteurização devido às múltiplas pontes dissulfeto. Possui um precursor, o plasminogênio, dominante no leite, que pode ser ativado e convertido em plasmina (FOX, 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Durante a produção de queijos, a plasmina permanece com as micelas de caseína, e assim contribui durante a maturação para a proteólise da α_{s2} - e β -caseínas (FOX, 2000). Segundo Damodaran, Parkin, Fennema (2010), a κ -caseína apresenta bastante resistência à ação da plasmina.

O produto mais utilizado para a coagulação do leite na produção de queijos é o coalho, extraído do abomaso de bezerros alimentados com leite. Contêm duas enzimas, a quimosina, responsável por 88 a 94 % da atividade de coagulação do leite, e a pepsina bovina participando com 6 a 12 % (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001).

O papel principal de quimosina na fabricação de queijos é de coagular o leite devido à hidrólise do domínio da κ -caseína na ligação Fen₁₀₅-Met₁₀₆, originando a extremidade N-terminal hidrofóbica da molécula, chamada de para- κ -caseína (f 1-105), que permanece ligada à micela, e a extremidade C-terminal hidrofílica, chamada de glicomacropéptido (f 106-169), que é perdida no soro. Acredita-se que essa região é muito susceptível à clivagem proteolítica pela quimosina devido ao fato de que os resíduos prolil, em ambos os lados da estrutura da κ -caseína, fazem com que se sobressaiam na superfície, aumentando a flexibilidade da cadeia (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Essa hidrólise

muda completamente as características da superfície da micela de caseína. Com o domínio polar da κ -caseína removido, ocorre a desestabilização das micelas. A para- κ -caseína liga-se ao Ca^{2+} , formando o paracaseinato de cálcio que precipita e forma o queijo (FOX et al., 2000; SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001; FARRELL et al., 2004).

A pepsina bovina, entretanto, é menos específica e muito proteolítica, causando hidrólise excessiva das caseínas, contribuindo com a diminuição do rendimento e com o sabor amargo de queijos, além de causar redução na vida útil (FOX, 1997).

No entanto, o aumento da produção de queijos, ligado a uma oferta cada vez menor de coalho animal natural, é responsável pelo aumento na demanda por fontes de coagulantes alternativos, de origem microbiana ou vegetal (GARCÍA et al., 2012). O gene da quimosina foi clonado e inserido em microrganismos, tais como *Rhizomucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica* e *Aspergillus niger* var. *awamori*, levando ao desenvolvimento de um coagulante composto por 100 % de quimosina (NEELAKANTAN, MOHANTY, KAUSHIK, 1999; SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001) e com isso diminuindo os problemas de sabor amargo causados pela pepsina bovina (BARBANO; RASMUSSEN, 1992).

A evolução da proteólise ocorre inicialmente com a hidrólise da α_{s1} -caseína por resíduos de quimosina e, em menor grau, a β -caseína pela plasmina, resultando na formação de peptídeos de alta massa molecular (insolúveis em água) ou massa molecular intermediária (solúveis em água). Posteriormente, esses peptídeos são degradados pelas proteinases extracelulares do envelope celular de culturas lácticas, que contribuem para a formação de peptídeos de baixa massa molecular. A produção de aminoácidos livres a partir de peptídeos pequenos é feita por peptidases intracelulares, que são liberadas com a lise celular (SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001; FURTADO, 2011, p. 93).

Este esquema geral da proteólise, entretanto, pode mudar substancialmente entre variedades de queijos de massa crua e cozida (SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001). A atividade proteolítica das enzimas utilizadas na produção do queijo é influenciada pela retenção da enzima no coágulo, que está por outro lado estritamente relacionada com o pH, a umidade do queijo e a intensidade de cozimento dos grãos (HAYALOGLU, KARATEKIN, GURKAN, 2014). A elevada

cocção da coalhada também pode causar inativação dos inibidores da plasmina, elevando a sua atividade em queijos de massa cozida. Já a alta temperatura pode desnaturar amplamente ou completamente o resíduo de coagulante presente na massa. Dessa forma, a contribuição da plasmina é maior em queijos suíços (SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Particularmente os fragmentos derivados da β -caseína ou κ -caseína são susceptíveis de desempenhar um papel importante nos perfis gerais de sabor em queijos (GOMEZ et al., 1997; PAUL et al., 2014). Porém a degradação da β -caseína é afetada negativamente pela alta concentração de sal e baixo pH (MOATSOU et al., 2002). Uma vez que a β -caseína apresenta baixa sensibilidade à quimosina, sua degradação depende principalmente da ação de enzimas microbianas (KIRMACI et al., 2014).

3.3 *Lactobacillus helveticus*

Uma vez que peptidases de bactérias lácticas podem reduzir o amargor e melhorar o sabor de queijos, vários pesquisadores têm identificado linhagens adequadas para utilizá-las como adjuntos de cultura na produção de queijos. As espécies utilizadas como coadjuvantes incluem linhagens de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (RAY, BHUNIA, 2007).

L. helveticus são bactérias Gram-positivas e termofílicas, que apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 42 °C e 45 °C e em pH entre 5,5 e 5,8. São anaeróbios facultativos e homofermentativos, produtores de compostos aromáticos e de uma alta quantidade de ácido lático que faz com que o ambiente fique ácido e iniba o crescimento de bactérias nocivas (AXELSSON, 1998; SLATTERY et al., 2010).

São encontrados em vários nichos ecológicos, que vão desde alimentos, solo, plantas, até do intestino delgado de humanos (SLATTERY et al., 2010), sendo tradicionalmente usados na produção de queijos de longa maturação, como Emmental, Gruyère e Grana Padano (FURTADO, 2011). Em queijo, os fatores principais que controlam o desenvolvimento deste microrganismo incluem a atividade de água e o pH (FOX et al., 2000).

O seu sistema proteolítico, composto por proteinases e peptidases, é altamente eficiente quando comparado com outras bactérias ácido lácticas (LAB) (VALENCE et al., 2000). As proteinases são responsáveis pela hidrólise das caseínas em oligopeptídeos e as peptidases pela hidrólise dos peptídeos em aminoácidos essenciais (GRIFFITHS, TELLEZ, 2013).

As proteinases do envelope celular (*Cell-Envelope Proteinase-CEP*) são enzimas essenciais para o crescimento das LAB porque melhoram a eficiência da absorção de nitrogênio (MIYAMOTO et al., 2015). De acordo com Sadat-Mekmene et al. (2011b) a maioria de LAB possuem apenas uma CEP, tais como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. rhamnosus* e *L. bulgaricus*. *L. helveticus* tem pelo menos duas CEP, como foi relatado na linhagem CNRZ32.

As CEP de *L. helveticus* são altamente específicas, uma vez que os locais de hidrólise nas caseínas diferem de uma linhagem para outra, dependendo do tipo de caseína (SADAT-MEKMENE et al., 2011a; JENSEN, VOGENSEN, ARDO, 2009). Sadat-Mekmene et al. (2011b) reportou que algumas CEP são capazes de hidrolisar mais a α_{s1} -caseína (f 1-23), outras degradam predominantemente a β -caseína e outras ainda capazes de hidrolisar, de forma semelhante, α_{s1} -, κ - e β -caseínas.

Diferentes estudos têm concordado que CEP de *L. helveticus* podem hidrolisar α_{s1} - ou β -caseínas em diferentes sítios de ligação, não especificamente relacionado a um tipo de aminoácido (GRIFFITHS, TELLEZ, 2013). Jensen, Vogensen e Ardo (2009) avaliaram que linhagens de *L. helveticus* hidrolisavam várias ligações na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica da β -caseína, enquanto outras linhagens hidrolisavam na extremidade N-terminal, sendo que a hidrólise da α_{s1} -caseína ocorre predominantemente nessa extremidade. Segundo Griffiths e Tellez (2013), outras linhagens já eram capazes de hidrolisar ambas as extremidades. Ainda segundo esses autores, as CEP de *L. helveticus* também são capazes de hidrolisar κ -caseína e α_{s2} -caseína, porém em menor grau.

Em estudos de adição de *L. helveticus* como cultura adjunta em queijos Cheddar, Prato e Suíço, foi observado que esse microrganismo coloniza o queijo rapidamente, persistindo até o final da maturação. Além disso, ocorre um aumento no grau de proteólise, com um aumento na concentração de peptídeos de médio e de baixa massa molecular (<0,5 kDa), além de aminoácidos livres, em um

período menor de maturação, a partir de 2 meses, o que indica que *L. helveticus* pode ser usado para acelerar a maturação. Também melhoram a aceitabilidade de diversos queijos, quando comparados aos adicionados somente de cultura *starter*, adquirindo maiores notas nos atributos textura, *flavor* e impressão global (BARROS et al., 2006; HANNON et al., 2007; SATO et al., 2012; GRIFFITHS, TELLEZ, 2013; SADAT-MEKMENE et al., 2013; SAHINGIL et al., 2014; GUIDONE et al., 2015).

L. helveticus têm sido amplamente estudado devido à sua capacidade de reduzir o amargor em queijos (SRIDHAR et al., 2005; SAHINGIL et al., 2014). Os peptídeos responsáveis pelo amargor são hidrofóbicos, derivados da β -caseína (f 193-209) e α_{S1} -caseína (f 1-9) (FARRELL et al., 2004; GRIFFITHS; TELLEZ, 2013). Segundo Damodaran, Parkin, Fennema (2010) as α_{S1} - e β -caseínas são as caseínas mais hidrofóbicas e a α_{S2} -caseína a que possui mais domínios polares.

Furtado (2011) recomenda que a temperatura ideal para a maturação de um queijo adicionado de *L. helveticus* deva estar entre 16 e 18 °C, porque dessa forma, o metabolismo bacteriano e as transformações bioquímicas no queijo serão aceleradas.

Em relação aos benefícios à saúde, têm sido atribuído a *L. helveticus* vários efeitos benéficos, como produção de peptídeos bioativos com ação antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e antitrombótica, diminuição da pressão arterial e melhoria nas funções cognitivas (Tabela 2) (TUOMILEHTO et al., 2004; XU et al., 2008; KORHONEN, 2009; CHAVES-LÓPEZ et al., 2014; CHEN et al., 2014; CHUNG et al., 2014). Na China, Croácia, Coréia do Sul e Índia, o *L. helveticus* é considerado e utilizado como probiótico (BEGANOVIC et al., 2013; KIM et al., 2015; SENAN et al., 2015; WANG et al., 2015).

L. helveticus é utilizado na produção de bebidas fermentadas, como Evolus (Valio[®], Finlândia) e Calpis (Calpis[®], Tóquio, Japão), que possuem propriedades associadas com a regulação da pressão sanguínea. Isto é devido à produção de níveis significativos de dois tripeptídeos bioativos (Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro) que são conhecidos por inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (GONZÁLEZ et al., 2014; WANG et al., 2015). Como a ECA converte a angiotensina I em angiotensina II, os inibidores dessa enzima reduzem a pressão sanguínea e a

Tabela 2 - Identificação de peptídeos biologicamente ativos e ocorrência em diversos produtos lácteos utilizando linhagens de *L. helveticus*

Sequência	Origem	Massa molecular teórica (Da)	Comentários*	Referência
VPP	β -CN (f 84–86)	311,0	Inibidor da ECA	Chen et al. (2014)
IPP	β -CN (f 74–76)	325,0	Inibidor da ECA	Chen et al. (2014)
LQSW	β -CN (f 140–143)	533,2	Inibidor da ECA	Maeno (1996)
HLPLP	β -CN (f 149–153)	533,2	Inibidor da ECA	Robert et al. (2004)
AVPYPQ	β -CN (f 192–197)	674,3	Relacionado com ECA, antioxidante	Robert et al. (2004)
KVLPVPQ	β -CN (f 169–175)	780,4	Inibidor da ECA	Maeno (1996)
KAVPYPQE	β -CN (f 176-182)	802,9	Relacionado com ECA, antioxidante	Robert et al. (2004)
NVPGEIVE	β -CN (f 7-14)	856,4	Relacionado com ECA, antitrombótico	Otte et al. (2011)
TESQSLTLT	β -CN (f 120-128)	980,0	Relacionado com ECA	Otte et al. (2011)
MKPWIQPK	α_{s2} -CN (f 190–197)	1027,5	Inibidor da ECA	Maeno (1996)
RPKHPIKHQ	α_{s1} -CN (f 1–9)	1140,0	Inibidor da ECA	Saito et al. (2000)
SLSQKVLPVPE	β -CN (f 164-175)	1283,5	Relacionado com ECA	Otte et al. (2011)
YPFPGPIP	β -CN (f 60–68)	1351,0	Inibidor da ECA	Saito et al. (2000)
QQPVLGPVRGPFPIIV	β -CN (f 194-209)	1718,1	Relacionado com ECA, antitrombótico	Otte et al. (2011)
HKEMPFKYPVQPF	β -CN (f 106-119)	1745,1	Relacionado com ECA	Otte et al. (2011)
YQEPVLGPVRGPFPIIV	β -CN (f 208–224)	1881,7	Relacionado com ECA, antitrombótico, antioxidante	Robert et al. (2004)
NIPPLTQTPVVPPFLQPEVM	β -CN (f 73-93)	2316,8	Relacionado com ECA	Otte et al. (2011)
SLPQNIPPL...KYPVQPF	β -CN (f 69-119)	5696,8	Relacionado com ECA	Otte et al. (2011)

CN: caseína;

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina;

*Segundo BIOPEP.

produção do hormônio aldosterona, ativando a ação depressora do hormônio bradicinina (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Desse modo, a aplicação de *L. helveticus* em queijos mostra-se vantajosa, tanto para a melhoria de características sensoriais, quanto por apresentar efeitos positivos na promoção da saúde.

3.4 *Enterococcus faecium*

Enterococos são bactérias lácticas na forma de cocos Gram positivos, homofermentativos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, temperatura ótima de crescimento de 37 °C, e com capacidade de crescer a 10 °C e 45 °C e na presença de 6,5 % de NaCl (MARTH, STEELE, 2001). O primeiro isolamento de *E. faecium* foi de matéria fecal, mas as cepas desta espécie são frequentemente isoladas, não só do trato gastrointestinal de animais (mamíferos, aves e répteis), mas também a partir de leite cru e de produtos lácteos (SARANTINOPOULOS, KALANTZOPOULOS, TSAKALIDOU, 2002).

Os efeitos benéficos de *E. faecium* foram demonstrados em ratos, como por exemplo a diminuição do tempo de duração de diarreias, redução dos níveis de LDL e aumento do HDL (ROSSI et al., 2000; LIONG, 2011) e diminuição da incidência de tumores no intestino (SIVIERI et al., 2008). Quando *E. faecium* CRL 183 é combinado com *L. helveticus* subsp *jugurti* 416, há evidências da prevenção da osteoporose (SIVIERI et al., 2008) e inibição parcial do câncer de mama (KINOUCI, 2006).

O queijo é um alimento versátil e atraente para muitos paladares e oferece uma alternativa valiosa como veículo de probióticos (RANADHEERA, BAINES, ADAMS, 2010). Sarantinopoulos, Kalantzopoulos e Tsakalidou (2002) avaliaram a viabilidade de *E. faecium* em queijo Feta, durante 60 dias de maturação e observaram que as contagens aumentaram durante o primeiro dia de maturação, atingindo números entre 5,8-6,6 log UFC.g⁻¹ e, em seguida, mantiveram-se quase constantes. Na avaliação sensorial os queijos adicionados de *E. faecium* foram mais aceitos do que o queijo controle adicionado apenas de cultura *starter*. Dessa forma, os autores concluíram que enterococos podem ter um papel desejável na produção

de queijo, uma vez que produzem compostos de sabor característico durante a maturação.

Kirmaci et al. (2014) observaram que queijo de leite de ovelha, produzido com *E. faecium* ATCC19434 apresentou degradação de α_{S1} -caseína e formação de peptídeos menores com rápida mobilidade electroforética, quando comparado ao queijo controle adicionado somente de cultura *starter*, indicando uma aceleração na proteólise.

Atualmente, enterococos são muito investigados como agentes patogênicos que causam infecções e/ou apresentam resistência e transferência de genes que codificam resistência à antibióticos, levantado questões sobre sua segurança para o uso como probiótico. Até o momento, não há relatos de doenças causadas por *E. faecium* EF1, o que é uma boa indicação de sua segurança. Além do mais, pesquisas têm demonstrado que essa linhagem, quando utilizada como probiótico, melhora a saúde animal, a microbiota intestinal e o desempenho do crescimento de animais (HUANG et al., 2012; LI et al., 2012).

Desse modo, a aplicação de *E. faecium* em queijos mostra-se promissora, por ser apontado como bactéria probiótica eficaz e com efeitos positivos na promoção da saúde humana e na qualidade de queijos.

3.5 *Curcuma longa* L.

Originária do sudeste da Ásia, principal produtora mundial, a cúrcuma (*Curcuma longa* L.), também conhecida como açafrão-da-Índia, açafrão-da-terra, e internacionalmente como *turmeric*, é uma planta herbácea da família *Zingiberaceae*, que apresenta de 60 a 100 cm de altura, folhas largas e compridas, flores pequenas de cor branca-amarelada e rizomas que podem medir até 10 cm de comprimento (Figura 3). Por vezes é confundida no Brasil com outra espécie, a *Crocus sativus* L., também denominada de açafrão verdadeiro (MAIA et al., 1995; FILHO et al., 2000; SCARTEZZINI, SPERONI, 2000; PEREIRA, SANTOS, 2013; FILHO et al., 2015).

A partir do rizoma seco e moído é extraído o pó amarelo-alaranjado, com aroma forte e gosto picante, amplamente utilizado como corante natural e condimento, dando cor e sabor ao *curry*, mostarda, molhos, caldo de galinha e sopas

(ALVIS et al., 2012). Sob condições de luz e contato com o oxigênio, a sua cor deteriora-se e, portanto é importante que a cúrcuma seja embalada e armazenada em condições adequadas (MARTINS, 1993).

O rizoma é constituído de 1,0 a 5,0 % de óleo essencial; 25 a 50 % de amido; 4 a 10 % de proteínas; 2 a 7 % de fibras e 3 a 7 % de cinzas. Há em torno de 1,8 a 5,4 % de pigmentos fenólicos responsáveis pela cor amarela, chamados de pigmentos curcuminóides, constituídos de curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, presentes nas concentrações de 60 %, 22 % e 18 %, respectivamente. A composição varia em função do cultivar, local de plantio, práticas agrícolas, uso de fertilizantes e maturidade dos rizomas (GOVINDARAJAN, 1980; MANGALAKUMARI, MATHEWS, 1988; GUTIERRES, 2011).

Figura 3 - Planta de *Curcuma longa* L. e rizoma moído



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2004)

A cúrcuma apresenta várias propriedades benéficas, como atividade antioxidante (AKINOLA et al., 2014), antiinflamatória (PRASAD, AGGARWAL, 2014), antimicrobiana (MAJOLO et al., 2014), antifúngica (NAGHETINI, 2006) e antiviral (MAZUMDER et al., 1995), além de efeitos benéficos no tratamento de doenças como diabetes (GUTIERRES, 2011); tumores (LIU et al., 2014), mal de Alzheimer (SANT'ANNA, 2012), depressão (BARANKEVICZ, 2015) e prisão de ventre (MICUCCI, 2013).

A adição de outros ingredientes em queijos é uma forma de inovar o produto, contribuindo para uma melhor qualidade nutricional e sensorial. Corantes, especiarias e agentes de sabor e aroma têm sido adicionados. Em doses pequenas a adição de corantes em queijos confere um tom amarelo-palha à massa, como é

tradicionalmente adicionado ao queijo Reino o corante vegetal annato ou urucum no queijo Estepe e Cheddar (FURTADO, 2007). No caso do queijo italiano Piacentinu, produzido na Itália, é adicionado açafrão ao leite antes da coagulação, dando uma cor amarelo brilhante ao produto (HORNE et al., 2005; CARPINO et al., 2008).

Segundo a ANVISA, Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), referente à incorporação de Aditivos Intencionais, é permitida a adição de cúrcuma em queijo, como corante natural, na quantidade suficiente para obter o efeito desejado. Por outro lado, os compostos presentes na cúrcuma podem ser tóxicos se ingeridos em quantidades excessivas. Sendo assim, a FAO (1990) destaca que a ingestão máxima diária aceitável para a curcumina deve ser de 0,0001 g / kg de peso corporal.

Considerando os benefícios à saúde e as características sensoriais do produto, o presente estudo propôs adicionar extrato de cúrcuma à matéria prima para a elaboração de queijo probiótico maturado visando a melhoria da qualidade nutricional e sensorial do produto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a elaboração dos queijos, foi utilizado leite pasteurizado e resfriado tipo A, não homogeneizado, obtido do laticínio De Leite[®], localizado na região de Londrina/PR. Foi empregado o coagulante comercial líquido fúngico (*Aspergillus niger* var. *awamori*) da marca Estrella[®], fornecido gentilmente pela empresa CHR-Hansen (Valinhos/SP). O sal iodado da marca Cisne[®] e a cúrcuma em pó da marca Kitano[®], foram adquiridos em supermercado da região de Londrina/PR.

As linhagens comerciais utilizadas eram puras e na forma liofilizada, compostas de *E. faecium* EF 1, *L. helveticus* LH 13 e a cultura *starter* MW 031 R, mesófila e homofermentativa, composta por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp., todas foram fornecidas pela Sacco[®] (Campinas/SP e Itália).

O padrão eletroforético *Precision Plus Proteins*[™] (Bio-Rad[®]), foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa.

Os reagentes utilizados para as análises físico-químicas foram de pureza grau analítico (P.A.).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização Físico-Química e Microbiológica do Leite Pasteurizado

As análises físico-químicas da matéria prima consistiram na avaliação do teor de gordura por butirômetro de Gerber (433/IV), pH (017/IV), acidez titulável (017/IV), extrato seco total por secagem direta em estufa a 105 °C (429/IV), teor de cinzas por incineração a 550 °C (018/IV), segundo Adolfo Lutz (2008), teor de proteínas (nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, AOAC, 1995 e fator de conversão 6,38) e lactose por diferença. Todas as análises ocorreram em triplicata. Para a avaliação da qualidade higiênico-sanitária, foram realizadas determinações de coliformes a 45 °C e *Salmonella* sp. e, para complementar, contagens de

bactérias lácticas totais, conforme métodos descritos em *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (HARRIGAN, 1976), como preconiza a Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 do MAPA (BRASIL, 2011), que regula a qualidade do leite tipo A cru refrigerado e pasteurizado.

4.2.2 Preparo dos Inóculos

Foram preparadas culturas estoque com as linhagens de *E. faecium* e *L. helveticus*, a partir da cultura liofilizada, onde 0,1 % (m/v) destas foram assepticamente adicionadas a um meio composto de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé®), reconstituído a 10 % (v/v) e adicionado de 15 % (v/v) de glicerol (previamente esterilizado e resfriado a 37 °C) e mantidos a -20 °C até o momento do uso.

As culturas foram ativadas pela transferência de 1,0 % (v/v) das culturas estoque para leite em pó desnatado, reconstituído a 10 % (v/v), previamente esterilizado, e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 22 a 24 horas. A reativação das culturas ocorreu através de duas transferências. Após a incubação, foram retiradas alíquotas para a determinação da contagem de colônias. O inóculo em leite utilizado para o queijo foi constituído de 1,0 % (v/v) de cultivo de *E. faecium* e 0,5 % (v/v) de *L. helveticus*. Para a cultura starter, foi utilizada a inoculação direta (*Direct Vat Set*) de 0,025 g.L⁻¹.

4.2.3 Produção do Extrato de Cúrcuma

O extrato de cúrcuma foi preparado baseando-se na metodologia descrita por Licón et al. (2012b). A concentração de 0,05 % (m/v) de cúrcuma moída em pó, determinada em testes preliminares, foi adicionada a um litro leite pasteurizado e mantido sob agitação em banho a 50 °C por 10 minutos para a extração da cor. Antes da adição para a produção dos queijos, o extrato foi filtrado em dessorador.

4.2.4 Produção do Queijo Minas Curado

Os queijos foram elaborados no laboratório de laticínios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, *campus* Londrina. Foram realizados três tratamentos distintos na elaboração dos queijos: queijo apenas com adição de cultura *starter* (Controle) contendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. lactis* ssp. biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp.; queijo adicionado de *E. faecium* e *L. helveticus* (T1); e queijo adicionado de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma (T2) (Tabela 3).

Tabela 3 - Tratamentos distintos envolvendo a produção de queijo Minas Curado

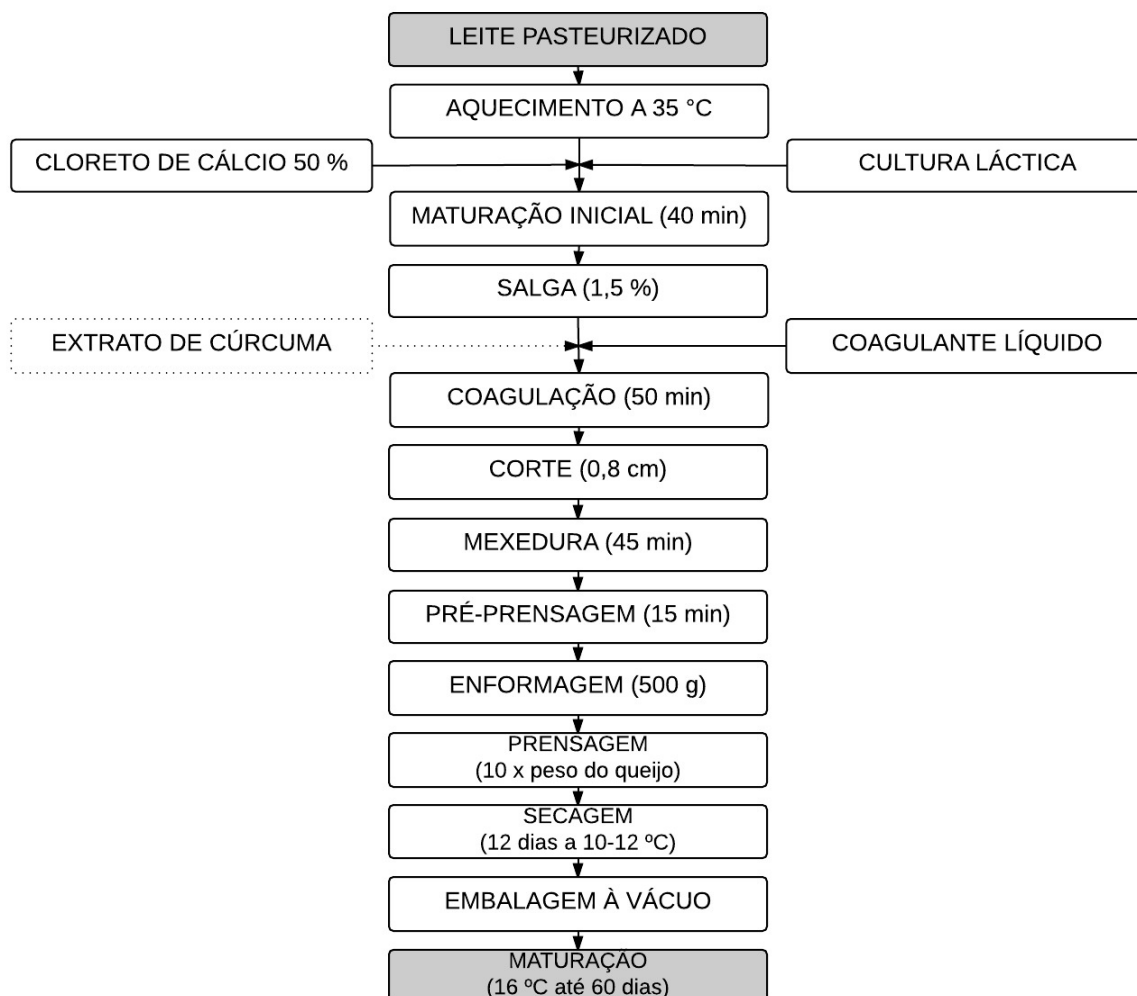
Tratamento	Cultura <i>starter</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Extrato de cúrcuma
Controle	+	-	-	-
T1	-	+	+	-
T2	-	+	+	+

**Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lac. lactis* ssp. *cremoris*, *Lac. lactis* ssp. biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp.;

+ = adição; - = sem adição.

A Figura 4 consta o fluxograma de fabricação utilizado para o queijo Minas Curado. Os queijos foram produzidos seguindo os procedimentos descritos por Furtado (2005), com adaptações. O leite pasteurizado (72 °C / 15 segundos) foi aquecido à temperatura de 35 °C, adicionada a solução de CaCl₂ 50 % (m/v), na proporção de 4 mL para cada 10 mil mL de leite e as culturas lácticas na proporção de 0,0025 % (m/v) para a cultura *starter*; 1,0 % (v/v) para *E. faecium* e 0,5 % (v/v) de *L. helveticus* ambos em leite desnatado, posteriormente aguardada a maturação inicial de 40 minutos. Foram adicionados 1,5 % (m/v) de sal, 1,0 litro de extrato de cúrcuma para o tratamento T2, e o coagulante líquido, na proporção especificada pelo fabricante. O tempo de coagulação foi de 50 minutos e a coalhada cortada com liras de aço inox, garantindo grãos de 0,8 cm de aresta. Após o corte, a massa repousou 5 minutos, e foi iniciada a mexedura até um tempo de 40 minutos. Logo após, foi efetuada a dessora e a massa pré-prensada por 15 minutos.

Figura 4 - Fluxograma de produção do queijo Minas Curado



Após as demais etapas, os queijos foram acondicionados em formas de queijo Minas Padrão, de 500 g, contendo dessoradores e prensados com peso dez vezes o peso do queijo. Foram efetuadas duas viragens, com intervalos variando de 30 minutos na primeira e uma hora na segunda. Após a prensagem, os queijos foram armazenados em B.O.D. por um período de 12 dias a 10 ± 2 °C para a secagem, sendo efetuadas viragens diárias durante os primeiros 10 dias, para que a perda de umidade fosse uniforme e garantisse o desenvolvimento da cor e formação da casca. Após esse período, os queijos foram embalados a vácuo em embalagens de polietileno e maturados em B.O.D. até 60 dias a 16 °C.

4.2.5 Preparo das amostras para análise

Antecedendo as análises, um queijo por vez foi cortado, retirado a casca, triturado e homogeneizado, para melhor amostragem, e retiradas assepticamente amostras para a contagem de microrganismos e determinação do pH, acidez titulável, umidade, proteína e extensão e profundidade de proteólise. Posteriormente, os queijos triturados foram colocados em frascos estéreis, devidamente identificados, e congelados a -20 °C.

4.2.6 Avaliação da Composição Centesimal dos Queijos

A avaliação da composição centesimal das amostras foi realizada conforme metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e AOAC (1995).

A avaliação físico-química consistiu na determinação do teor de umidade por secagem direta em estufa a 105 °C (012/IV), teor de cinzas por incineração a 550 °C (018/IV), teor de gordura utilizando butirômetro de Gerber para queijo, gordura no extrato seco – GES (Equação 1) (465/IV) e sal (028/IV), seguindo as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O teor de proteínas (nitrogênio total pelo método de Kjeldahl e fator de conversão 6,38) segundo a AOAC (1995). As análises foram realizadas em triplicatas.

$$\% \text{ GES} = \frac{\% \text{ Gordura}}{\% \text{ Extrato Seco Total}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Para o cálculo do rendimento, os queijos foram pesados após o período de dessoragem de 24 horas. O rendimento obtido foi calculado dividindo o volume de leite pelo peso total de queijo. O rendimento previsto foi calculado a partir de um modelo polinomial de 2º grau, proposto por Alves (1995), conforme a Equação 2. O modelo correlaciona o rendimento em L/kg com os teores de gordura (G) e caseína (C) do leite (valor teórico de 80 %) e umidade (U) do queijo. Os resultados foram expressos em litros de leite por quilo de queijo.

$$\text{Rendimento} = 26,59 - 3,80(G) + 0,33(G)^2 - 0,80(C) - 0,14(U) \quad (\text{Equação 2})$$

O erro relativo médio foi calculado conforme a Equação 3.

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{|\text{Rendimento obtido} - \text{Rendimento previsto}|}{\text{Rendimento obtido}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.2.7 Análise Microbiológica dos Queijos

Cerca de 10 g de queijo de cada tratamento, foram homogeneizados em 90 mL de água peptonada a 0,1 % (diluição 10^{-1}), seguido de diluições seriadas e, então semeadas em placas, em triplicata, pela técnica de *pour-plate*. As contagens foram realizadas no dia seguinte à fabricação (0 dia) do queijo e após 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação e expressas em $\log \text{UFC.g}^{-1}$ de queijo.

Para a contagem de bactérias lácticas totais, que inclui o *L. helveticus* e bactérias lácticas não *starters*, foi utilizado o ágar *Man Rogosa and Sharp* - MRS, adicionado de ácido acético P.A. até pH 5,4; e incubados sob anaerobiose, utilizando jarra e gerador de anaerobiose (Probac[®]), de acordo com o método descrito por Thierry et al. (1998), com modificações. A contagem de *E. faecium* foi realizada segundo *International Dairy Federation* – IDF (1991), utilizando meio seletivo ágar KF *Streptococcus*, suplementado com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1,0 % (m/v) na quantidade de 10 mL/L, e incubados em aerobiose. Para a contagem de bactérias lácticas totais na amostra Controle, adicionada de cultura *starter*, foi utilizado o ágar M17 e incubação em aerobiose, segundo descrito por Licón et al. (2012a). Todas as placas foram incubadas invertidas por 48 a 72 horas a 37 °C.

4.2.8 Determinação do pH e Acidez Titulável

A determinação do pH foi conduzida em potenciômetro, previamente calibrado com soluções-tampões comerciais de pH 4 e 7, conforme o método 017/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). A acidez titulável foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio - NaOH 0,1 M, conforme o método 016/IV do

Instituto Adolfo Lutz (2008). O resultado foi expresso em g de ácido láctico.100 g⁻¹ de queijo.

4.2.9 Determinação do teor de curcumina por método colorimétrico

O teor de curcumina na cúrcuma moída e nos queijos foi avaliado por método colorimétrico, utilizando espectrofotômetro UV/VIS (107/IV), segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008, p. 220), com modificações. Foi pesado cerca de 0,1 g de amostra, adicionado 30 mL de álcool etílico absoluto (99,5 %) e mantido em banho à 50 °C com agitação por duas horas e meia. Em seguida, foi filtrado em papel filtro, diluído em balão volumétrico de 100 mL e completado com álcool. Posteriormente, 20 mL deste extrato foram pipetados para outro balão volumétrico de 250 mL, completado o volume e realizada a leitura a 425 nm em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom®, Reino Unido), utilizando álcool e cubetas de 1 cm. Para o cálculo do teor de curcumina foi utilizado o valor de absorvidade $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1607$. O resultado foi expresso em gramas de curcumina por 100 gramas de amostra em base seca (g curcumina.100 g⁻¹ amostra).

4.2.10 Cor

A medida de cor foi feita com colorímetro digital Minolta CR-400 (Minolta, Tóquio, Japão) utilizando o sistema CIELab (L^* , a^* e b^*), onde L^* representa a luminosidade e varia de 0 a 100, entre preto e branco, a^* representa a posição da cor entre o vermelho e o verde, e b^* representa a posição da cor entre o amarelo e azul, com iluminante D65. A calibração foi feita utilizando uma placa de referência Minolta 17133035 com $Y = 85,9$, $x = 0,3186$, e $y = 0,3362$, em que Y = luminância e x e y representam as coordenadas da cor cromática no diagrama de cromaticidade da CIE 1931. A medida foi feita diretamente na superfície transversal do queijo, imediatamente após o corte em metades de 3 cm de aresta. Três medidas foram obtidas para cada pedaço de queijo.

4.2.11 Determinação de Fenólicos Totais

A extração ocorreu de acordo com o método descrito por Hung et al. (2009), onde 1,0 g de amostra liofilizada foi misturada em etanol 80 % (1:10, m/v) e mantida sob agitação por 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, foi centrifugado a 2500 g por 20 minutos e o sobrenadante coletado e submetido à extração por mais duas vezes, nas mesmas condições. Por fim, o extrato foi concentrado em rota evaporador (MARCONI MA 120, São Paulo, Brasil) a 50 °C, até atingir um volume final de 10 mL e armazenado a -20 °C, em frasco âmbar, até o momento da análise.

Os fenólicos totais foram determinados conforme o método de Folin-Ciocalteu descrito por Swain e Hills (1959). Cerca de 0,5 mL do extrato foi homogeneizado com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10 % (v/v) e incubado a 50 °C por 5 minutos, para a reação colorimétrica. Logo depois, foi adicionado 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5 % (m/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido) a 760 nm. A quantificação foi realizada usando uma curva padrão de ácido gálico (0,1-0,5 mM) (Sigma, Alemanha) e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mg EAG.100 g⁻¹).

4.2.12 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH·

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos em capturar o radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma, Alemanha), foi avaliada seguindo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Foram misturados 50 µL do extrato obtido (item 4.2.11); 1,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,5); 1,0 mL de etanol absoluto e 0,5 mL de solução de DPPH 350 µM, e foi mantido no escuro por 30 minutos para reagir. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido) a 517nm. Como um controle, foi utilizado 0,5 mL etanol 80 % (v/v).

A quantificação da atividade antioxidante foi realizada utilizando uma curva padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, Sigma, Alemanha), 100-1000 µM, e os resultados foram expressos em µmol de Trolox por g de amostra em base seca (µmol Trolox.g⁻¹).

4.2.13 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais ABTS^{•+}

A metodologia descrita por Sanches-Gonzales, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) foi utilizada para a avaliação da capacidade antioxidante pelo sequestro do cátion radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico], Sigma, Alemanha). Cerca de 5,0 mL de solução de ABTS 7 mM foi misturado com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM e deixado reagir em ambiente escuro por 15 horas. Posteriormente, a solução obtida foi diluída com etanol absoluto até absorvância 700 a 734 nm. A análise consistiu na mistura de 30 µL do extrato (item 2.2.10) com 3,0 mL da solução diluída de ABTS e, após 6 minutos de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido) a 734 nm.

Uma curva padrão de Trolox (Sigma, Alemanha), 100-2000 µM, foi utilizada para a quantificação da atividade antioxidante, e os resultados expressos em µmol de Trolox por g de amostra em base seca (µmol Trolox g⁻¹).

4.2.14 Determinação do poder redutor: Capacidade de Redução do Ferro - FRAP

O poder de redução dos extratos, pelo método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), foi avaliado de acordo com método de Rufino et al. (2006). Este método baseia-se na habilidade do extrato em reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPTZ), para formar Fe²⁺, de intensa cor azul.

No momento do uso, foi preparado o reagente de FRAP, utilizando tampão acetato 300 mM (pH 3,6), TPTZ 10mM em HCl 40 mM e cloreto férrico 20 mM, na proporção de 10:1:1. Para a avaliação da atividade antioxidante, 90 µL do extrato foi misturado com 270 µL de água destilada e 2700 µL do reagente FRAP. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm em espectrofotômetro UV-visível (modelo Libra S22, Biochrom[®], Reino Unido).

Através de uma curva de calibração de sulfato ferroso (Sigma, Alemanha), 500-1500 µM, foi utilizada para a quantificação da atividade antioxidante e os resultados foram expressos em µmol de sulfato ferroso por g de amostra em base seca (µmol sulfato ferroso.g⁻¹).

4.2.15 Índice de Extensão e de Profundidade da Proteólise

Os índices de extensão e de profundidade foram avaliados pelo método de precipitação, utilizando ácido clorídrico 1,41 mol/L (v/v) e ácido tricloroacético (TCA) 12 % (m/v), respectivamente, e o nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl, segundo descrito pela AOAC (1995).

O índice de extensão da proteólise foi calculado pela razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total, multiplicado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983), como apresentado na Equação 4.

$$\text{Extensão da proteólise} = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel em pH 4,6}}{\% \text{ Nitrogênio Total}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

O índice de profundidade da proteólise foi calculado pela razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12 % e nitrogênio total, multiplicado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983), conforme a Equação 5.

$$\text{Profundidade da proteólise} = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel em TCA 12 \%}}{\% \text{ Nitrogênio Total}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

4.2.16 Perfil de massa molecular de peptídeos pelo método eletroforético SDS-PAGE

A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, contendo 20 % de acrilamida, descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970), com modificações. Amostras de queijo foram diluídas em água destilada, submetidas ao sonicador por 10 minutos e agitação constante por 24 horas a 18 °C. Em seguida, foram diluídas em tampão Laemmli contendo 12,5 % de tampão Tris-HCl (Bio-Rad®) e 5 % de β-mercaptoetanol, pH 6,8 e submetido a fervura por 5 minutos antes da aplicação. O padrão *Precision Plus Proteins*TM (Bio-Rad®) de 250 kDa a 10 kDa foi utilizado. Foram usadas placas de vidro 0,75 mm e pente com 12 poços. O gel correu a 200 V, 10 mA, por 90 minutos e depois foi corado com Azul de Comassie Brilhante G-250 (Vetec®). Após a coloração durante a

noite, os géis foram descorados e visualizados usando o equipamento *Transiluminator* L-PIX-HE com sistema de captura de imagem (Loccus[®] biotecnologia) e software L-PIX Image.

4.2.17 Análise das Condições Higiênico-Sanitárias

Previamente à análise sensorial, as amostras foram avaliadas microbiologicamente, conforme o padrão microbiológico sanitário exigido pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001a), para queijos com umidade entre 46 a 55 %, com bactérias lácticas abundantes e viáveis.

Foram realizadas análises de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp., conforme métodos descritos no *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (HARRIGAN, 1976).

4.2.18 Análise Sensorial

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), parecer número 1.036.296 (Anexo A). O questionário para a coleta de dados do provador e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido estão nos anexos B e C, respectivamente.

4.2.18.1 Condições do teste e preparo das amostras

O teste foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL e no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, campus Londrina, Paraná, Brasil. Os julgadores realizaram o teste em cabines individuais com luz branca, à temperatura ambiente.

Para a avaliação sensorial, os queijos foram cortados em cubos de 1,5 cm de aresta. As amostras (≈ 10 °C) foram servidas em pratos plásticos brancos descartáveis codificados com números de três dígitos aleatórios.

4.2.18.2 Teste de aceitação de atributos

Os queijos com 20 dias de maturação foram avaliados, em ordem aleatória, em uma sessão com as três amostras (Controle, T1 e T2). As amostras codificadas foram apresentadas monadicamente aos julgadores que avaliaram os atributos aparência, aroma, sabor, textura e avaliação global, utilizando a escala hedônica de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo), de acordo com a Ficha de avaliação (Anexo D). A equipe de julgadores foi formada por 98 indivíduos não treinados (57 % do sexo masculino e 43 % do sexo feminino), sendo 83 % alunos de graduação. Cerca de 50 % dos participantes consomem queijos frequentemente (um a três vezes por semana), sendo que 69 % consumiam queijos maturados. Aproximadamente 43 % afirmaram consumir produtos contendo probióticos numa frequência moderada e 90 % afirmaram nunca ter consumido cúrcuma.

4.2.19 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em triplicata e todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação entre médias de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistica 10.0 (STATSOFT, INC. 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO

Segundo o MAPA (BRASIL, 2011), o leite tipo A deve ter no mínimo 3 g.100 mL⁻¹ de gordura, acidez de 14 a 18 °Dornic, extrato seco desengordurado de no mínimo 8,4 g.100 mL⁻¹ e proteína de no mínimo 2,9 g.100 mL⁻¹. Observando a Tabela 4, verifica-se que esses parâmetros estão dentro do estabelecido pela legislação. As matérias primas também não apresentaram contagens de bactérias lácticas totais e coliformes a 45 °C, e ausência de *Salmonella* sp., como preconiza a legislação.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado tipo A utilizado para a produção dos queijos Controle (Lote 1) e do leite utilizado para a produção dos queijos T1 e T2 (Lote 2)

Parâmetros	Leite pasteurizado tipo A	
	1	2
pH	6,63 ± 0,05 ^a	6,61 ± 0,07 ^a
Acidez titulável (°Dornic)	15,25 ± 0,25 ^b	16,46 ± 0,51 ^a
Extrato Seco Desengordurado (g.100 mL ⁻¹)	9,11 ± 0,18 ^a	8,47 ± 0,05 ^b
Gordura (g.100 mL ⁻¹)	3,63 ± 0,06 ^b	4,13 ± 0,25 ^a
Proteína (g.100 mL ⁻¹)	3,91 ± 0,20 ^a	3,19 ± 0,11 ^b
Lactose (g.100 mL ⁻¹)	4,56 ± 0,12 ^a	4,51 ± 0,23 ^a
Bactérias lácticas totais (log UFC.mL ⁻¹)	Ausência	Ausência
<i>Salmonella</i> sp. 25.mL ⁻¹	Ausência	Ausência
Coliformes a 45 °C (NMP.mL ⁻¹)	Ausência	Ausência

Média ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

Lote 1: leite utilizado para a produção do queijo Controle; Lote 2: leite utilizado para a produção dos queijos T1 e T2.

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS QUEIJOS

Os rendimentos dos queijos produzidos foram maiores do que o esperado. O Controle e os tratamentos T1 e T2, apresentaram, respectivamente, rendimento de 6,40; 6,03 e 5,99 litros de leite / kg de queijo. Segundo Furtado (2005), o rendimento médio do queijo Minas Padrão é de 7,5 a 8,5 litros de leite por kg de queijo maturado por no mínimo 20 dias e com umidade entre 46-49 %, podendo variar dentre outros com a composição do leite e o teor de umidade do queijo. Apesar do leite utilizado no Controle conter maior quantidade de proteínas, observou-se que o rendimento do Controle e do tratamento T1 foram maiores. Isso pode ter ocorrido devido à maior quantidade de gordura contida no leite utilizado para a produção desses tratamentos.

Na Tabela 5, são apresentados os valores do rendimento previsto a partir do modelo polinomial de segunda ordem e erro relativo médio. O rendimento previsto para o leite Lote 1 foi de $7,75 \pm 0,21$ L de leite / kg de queijo e para o Lote 2 de $7,37 \pm 0,34$ L/kg, e o erro relativo de 21,06 % e 22,57 %, respectivamente, não apresentando diferenças relevantes.

Tabela 5 – Valores do rendimento previsto, a partir do modelo polinomial do 2º grau proposto e cálculo do erro relativo médio

Lote (leite)	Gordura no leite (%)	Caseína no leite (%)*	Umidade do queijo (%)	Rendimento previsto (L/kg)	Rendimento obtido (L/kg)	Erro relativo (%)
1	$3,63 \pm 0,06$	$3,13 \pm 0,16$	$49,22 \pm 0,99$	$7,75 \pm 0,21$	$6,40 \pm 0,00$	21,06
2	$4,13 \pm 0,25$	$2,55 \pm 0,09$	$50,83 \pm 0,79^{**}$	$7,37 \pm 0,34$	$6,01 \pm 0,00$	22,57

*Valor teórico de 80 % de caseína em proteínas totais (FENNEMA, 2010);

**Média dos queijos T1 e T2 após 24 horas de produção (tempo 0)

O presente estudo utilizou um modelo polinomial formulado para queijo Prato devido à falta de modelos aplicados a queijo Minas. Apesar dos modelos empíricos representarem uma aproximação, apresenta-se como um bom fator de controle na fabricação, uma vez que a previsão de rendimento constitui uma base para o cálculo da rentabilidade (ALVES, 1995).

Os resultados médios da composição centesimal dos queijos Controle, T1 e T2, durante o período de maturação de 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias, são apresentados na Tabela 6.

As características apresentadas pelo queijo Minas Curado classificam-no como sendo queijo gordo (45,0 a 59,9 % de gordura no extrato seco) e queijo de alta umidade (46,0 e 54,9 % de umidade) e média umidade (36,0 e 45,9% umidade) ao final da maturação (BRASIL, 1996).

O teor de proteínas somente não apresentou diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos no 14º dia de maturação. Martins (2014) determinou valores médios de proteína em queijo tipo Minas Padrão curado por 45 dias de $22,50 \pm 1,43$ %, próximo aos valores encontrados nesse estudo. De acordo com Perry (2004) um queijo com 48 % de gordura no extrato seco (GES) contém entre 23 % e 25 % de proteína.

O parâmetro umidade, não apresentou diferença significativa até 7 dias de maturação para os três tratamentos estudados. Diminuiu com o tempo de maturação, permanecendo em torno de 44 e 47 % de umidade, como o esperado. Segundo Furtado (2005), o queijo Minas Curado maturado no mínimo 20 dias deve apresentar entre 46 e 49 % de umidade. Rocha (2004) determinou 44,8 % de umidade em queijo Minas Padrão de 21 dias de maturação e Martins (2014), 49,61 % de umidade em 45 dias de maturação.

Foram observados, para o Controle, teores de sal consideravelmente menores no tempo 0, contudo a partir de 7 dias de secagem, o Controle apresentou valores similares estatisticamente ($p > 0,05$) aos demais. Segundo Furtado (2011), o teor de sal naturalmente aumenta durante a maturação devido à desidratação dos queijos, sendo que o esperado em queijo Minas Padrão maturado no mínimo 20 dias, segundo Furtado (2005), é de 1,4 % a 1,6 % (m/m). Neste estudo, o teor de sal para o Controle, T1 e T2, com 30 dias de maturação, foi de $1,13 \pm 0,05$; $1,28 \pm 0,26$ e $1,14 \pm 0,09$ g.100 g⁻¹, respectivamente.

Tabela 6 - Médias e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos, determinados nas amostras Controle, T1 e T2 de queijos Minas Curado, no período de maturação de 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias

Parâmetros (g.100g ⁻¹)		Tempo de Maturação (dias)					
		0	7	14	30	45	60
Proteína	C	25,15 ± 1,26 ^{Aa}	25,28 ± 1,13 ^{Aa}	24,27 ± 2,04 ^{Aa}	24,36 ± 0,23 ^{Aa}	23,84 ± 0,68 ^{Aa}	23,71 ± 0,81 ^{Aa}
	T1	22,73 ± 1,37 ^{ABa}	21,95 ± 0,67 ^{Ba}	22,18 ± 2,13 ^{Aa}	21,49 ± 0,18 ^{Ba}	21,49 ± 0,17 ^{Ba}	21,49 ± 0,18 ^{Ba}
	T2	21,88 ± 1,19 ^{Ba}	21,78 ± 1,14 ^{Ba}	21,98 ± 1,85 ^{Aa}	21,50 ± 1,14 ^{Ba}	21,28 ± 1,45 ^{Ba}	21,51 ± 1,82 ^{Ba}
Umidade	C	49,22 ± 0,99 ^{Aab}	49,80 ± 0,12 ^{Aa}	48,42 ± 0,11 ^{Babc}	47,64 ± 0,16 ^{Abc}	47,25 ± 1,11 ^{Abc}	46,72 ± 0,83 ^{Ac}
	T1	51,25 ± 0,39 ^{Aa}	49,07 ± 0,65 ^{Ab}	48,74 ± 0,11 ^{Bb}	46,04 ± 1,40 ^{ABc}	44,70 ± 0,84 ^{Ac}	43,86 ± 0,98 ^{Bc}
	T2	50,41 ± 0,93 ^{Aa}	49,87 ± 0,07 ^{Aa}	50,00 ± 0,70 ^{Aa}	45,08 ± 0,60 ^{Bb}	44,55 ± 1,72 ^{Ab}	45,39 ± 1,03 ^{ABb}
Sal	C	0,75 ± 0,03 ^{Bb}	0,99 ± 0,06 ^{Aa}	1,10 ± 0,08 ^{Aa}	1,13 ± 0,05 ^{Aa}	1,16 ± 0,08 ^{ABa}	1,13 ± 1,00 ^{Aa}
	T1	1,05 ± 0,02 ^{Aa}	1,05 ± 0,04 ^{Aa}	1,26 ± 0,10 ^{Aa}	1,28 ± 0,26 ^{Aa}	1,36 ± 0,13 ^{Aa}	1,31 ± 0,16 ^{Aa}
	T2	1,12 ± 0,05 ^{Ab}	1,05 ± 0,07 ^{Ab}	1,28 ± 0,02 ^{Aa}	1,14 ± 0,09 ^{ABb}	1,06 ± 0,02 ^{Bb}	1,13 ± 0,08 ^{ABb}
Gordura	C	21,17 ± 0,29 ^{Bc}	21,83 ± 0,29 ^{Bc}	24,00 ± 1,00 ^{Ab}	24,33 ± 0,58 ^{Bb}	25,17 ± 0,29 ^{Bab}	26,67 ± 0,58 ^{Ba}
	T1	24,50 ± 0,00 ^{Ac}	24,53 ± 0,06 ^{Ac}	25,33 ± 0,58 ^{Ac}	29,00 ± 0,00 ^{Ab}	30,00 ± 1,00 ^{Aab}	31,00 ± 1,00 ^{Aa}
	T2	24,50 ± 0,00 ^{Ab}	24,50 ± 0,00 ^{Ab}	24,10 ± 0,17 ^{Ab}	30,00 ± 1,73 ^{Aa}	31,50 ± 0,87 ^{Aa}	30,33 ± 1,15 ^{Aa}
GES	C	41,68 ± 0,57 ^{Cd}	43,49 ± 0,58 ^{Bcd}	46,53 ± 1,94 ^{Bb}	46,47 ± 1,10 ^{Bbc}	47,71 ± 0,55 ^{Bab}	50,05 ± 1,08 ^{Ba}
	T1	50,26 ± 0,00 ^{Ab}	48,17 ± 0,11 ^{Ab}	49,05 ± 1,12 ^{ABb}	53,74 ± 0,00 ^{Aa}	54,25 ± 1,81 ^{Aa}	55,22 ± 1,78 ^{Aa}
	T2	49,40 ± 0,00 ^{Bc}	48,87 ± 0,00 ^{Ac}	50,20 ± 0,35 ^{Abc}	54,63 ± 3,15 ^{Aab}	56,81 ± 1,56 ^{Aa}	55,54 ± 2,11 ^{Aa}
Cinzas	C	2,60 ± 0,02 ^{Ae}	2,79 ± 0,02 ^{Ad}	2,91 ± 0,02 ^{Abc}	3,03 ± 0,06 ^{Aab}	3,08 ± 0,08 ^{Aa}	2,81 ± 0,03 ^{ABcd}
	T1	2,49 ± 0,17 ^{Ab}	2,57 ± 0,03 ^{Bb}	2,89 ± 0,05 ^{Aa}	2,90 ± 0,05 ^{Aa}	2,90 ± 0,04 ^{Aa}	2,87 ± 0,05 ^{Aa}
	T2	2,44 ± 0,03 ^{Ab}	2,50 ± 0,02 ^{Cab}	2,70 ± 0,06 ^{Ba}	2,62 ± 0,01 ^{Bab}	2,60 ± 0,05 ^{Bab}	2,67 ± 0,09 ^{Ba}

Média ± desvio padrão (n=3);

A, B – letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

a, b – letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

*GES – Gordura no Extrato Seco; C: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*; T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

O tratamento T1 apresentou teor de GES significativamente menor ($p < 0,05$) que os outros tratamentos em todo o período de maturação. No parâmetro gordura foi observado que o Controle só não apresentou diferenças significativas com relação a outros tratamentos no tempo 14 dias. Isso ocorreu devido, a composição do leite utilizado para a produção dos queijos Controle, que apresentou teores de nitrogênio total maior e de gordura menor que o leite utilizado para a produção dos queijos T1 e T2. Furtado (2005) menciona que o teor de GES esperado em queijo Minas Padrão está entre 43 a 49 % e gordura entre 23 a 25 %.

O teor de cinzas apresentou um aumento constante durante o período de maturação, com valores próximos aos encontrados por Martins (2014), que obteve $2,91 \pm 0,02$ % cinzas (m/m). Entretanto, a partir de 7 dias de maturação, o tratamento T2 apresentou valores significativamente menores ($p < 0,05$) do que os outros tratamentos.

Segundo Hayaloglu, Karatekin e Gurkan (2014), o tipo ou concentração de coagulante não influencia nos teores de sólidos totais e de gordura em queijo Malatya (queijo tradicional do Oriente Médio), enquanto teores de proteína e sal foram afetados. Também acrescentaram que alguns pesquisadores não obtiveram diferenças nas composições químicas de diferentes queijos.

5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS, pH E ACIDEZ TITULÁVEL

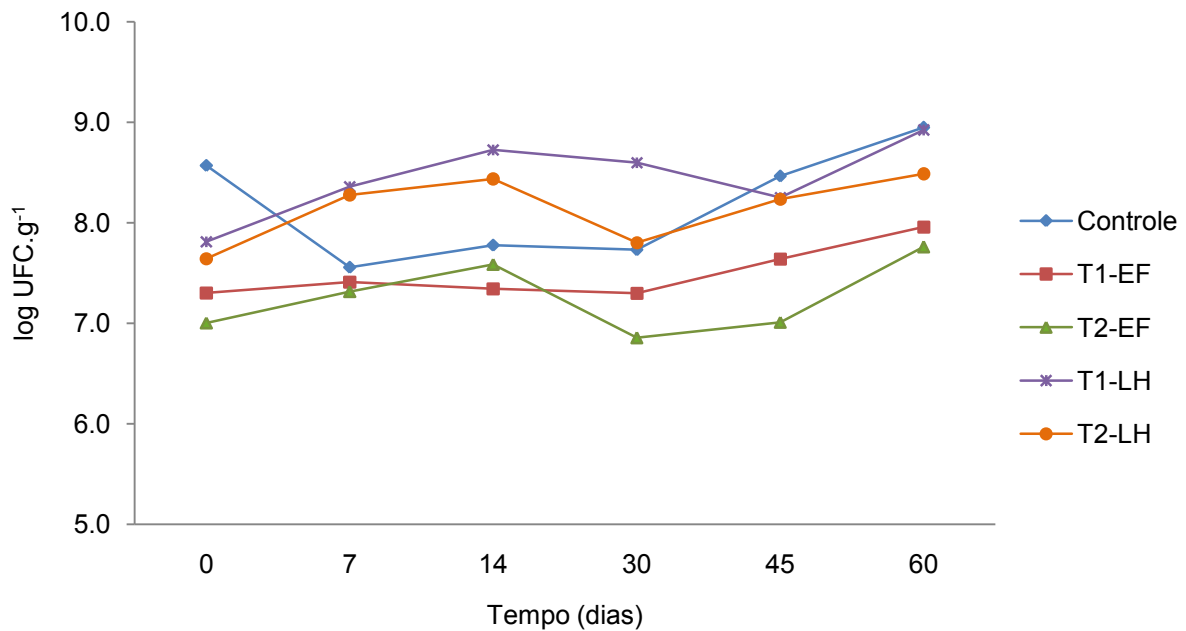
Contagem de bactérias lácticas totais dos queijos Controle, contagens de células viáveis *E. faecium* e bactérias lácticas totais em amostras de T1 e T2 com 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação são apresentadas na Figura 5.

As contagens iniciais dos queijos Controle foram de $8,57 \pm 0,01$ log UFC.g⁻¹, e durante a maturação houve um decréscimo da contagem, permanecendo em torno de 7,5 log UFC.g⁻¹. Porém, com o término do período de maturação, houve crescimento, alcançando contagens de $8,95 \pm 0,04$ log UFC.g⁻¹.

Os inóculos, constituídos de 1,0 % (v/v) de cultivo de *E. faecium*, apresentaram contagens em torno de 8 log UFC.mL⁻¹ de leite. Quando foram adicionados ao leite para a produção dos queijos, houve um efeito de diluição, e as contagens iniciais dos tratamentos diminuíram aproximadamente 1 ciclo log, no tempo 0 (dia após a produção), para $7,30 \pm 0,23$ log UFC.g⁻¹ no tratamento T1

e $7,00 \pm 0,07 \log \text{UFC.g}^{-1}$ no tratamento T2, não havendo diferenças estatísticas entre as contagens ($p \geq 0,05$).

Figura 5 - Contagem de bactérias lácticas totais dos queijos Controle, contagens de células viáveis *E. faecium* e bactérias lácticas totais em amostras de T1 e T2 com 0 (dia após a produção), 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação.



Média \pm desvio padrão ($n=3$); Controle: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*; T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma; Controle: Contagem de bactérias lácticas totais capazes de desenvolvimento em ágar M17 dos queijos Controle; EF: Contagem de células viáveis de *E. faecium*, em ágar KF *Streptococcus*, dos queijos T1 e T2; LH: Contagem de bactérias lácticas totais em ágar MRS acidificado, que inclui *L. helveticus* e bactérias lácticas não *starters*, dos queijos T1 e T2.

Durante a maturação, a contagem de *E. faecium* do tratamento T1 permaneceu constante até 30 dias de maturação, apresentando valores entre 7,0 a 7,5 $\log \text{UFC.g}^{-1}$. A partir de 30 dias, houve um aumento na contagem, atingindo $7,96 \pm 0,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$ com 60 dias de maturação. O tratamento T2 apresentou um aumento constante nas contagens até 14 dias, atingindo valores entre 7,2 e 7,5 $\log \text{UFC.g}^{-1}$ e a partir disso, as contagens diminuíram significativamente para $6,86 \pm 0,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Entretanto, com 60 dias de maturação, houve novamente um aumento na contagem, atingindo $7,76 \pm 0,07 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

Em média, o abaixamento de umidade e aumento do sal em solução nos queijos pode ter favorecido o aumento das contagens de *E. faecium*. Segundo Tzanetakis, Vafopoulou-Mastrojiannaki e Litopoulou-Tzanetaki (1995), durante a

maturação de queijo Feta, devido ao aumento da concentração de sal, a microbiota láctica naturalmente predominante (culturas *starters*) é gradualmente substituída por lactobacilos (*L. plantarum*) e enterococos (*E. faecium* e *E. durans*), que são mais resistentes ao sal.

Durante a maturação a 16 °C houve uma diminuição nas contagens de *E. faecium*, para os dois tratamentos (T1-EF e T2-EF), em torno dos 30 dias de maturação. Contudo após 60 dias de maturação, as contagens atingiram $7,96 \pm 0,05$ e $7,76 \pm 0,07$ log UFC.g⁻¹, para os tratamentos T1 e T2 respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si ($p \geq 0,05$). Em média, o abaixamento de umidade e aumento do sal em solução nos queijos pode ter favorecido o aumento das contagens de *E. faecium*.

Para que produtos contendo probióticos possam atuar *in vivo*, é essencial que o alimento contenha no mínimo 10^8 a 10^9 UFC por porção do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008). Nesta pesquisa, as contagens de *E. faecium* viáveis se mantiveram na faixa de 10^7 a 10^8 UFC.g⁻¹ ao longo do período de maturação. Considerando-se a porção média de queijo de 30 gramas (BRASIL, 2001b), as contagens de *E. faecium* deveriam estar entre $3,0 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^9$ UFC por porção de queijo, o que indica que as contagens foram atingidas e atenderam a legislação, pois ambos os queijos, T1 e T2, apresentaram, respectivamente, $2,7 \times 10^9$ e $1,7 \times 10^9$ UFC na porção, após 60 dias de maturação.

Os inóculos, constituídos de 0,5 % (v/v) de *L. helveticus*, apresentaram contagens acima de 9 log UFC.mL⁻¹ de leite. Quando adicionados ao leite a produção dos queijos, apresentou o mesmo efeito de diluição observado nas contagens de *E. faecium*, com diminuição de mais de 1 ciclo log. Com isso, a contagem inicial do tratamento T1 foi de $7,81 \pm 0,15$ log UFC.g⁻¹ e do tratamento T2 de $7,65 \pm 0,05$ log UFC.g⁻¹, sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

Aos 14 dias de maturação, os tratamentos (T1-LH e T2-LH) aumentaram aproximadamente 1 ciclo log cada. Com 30 dias de maturação, foi observada uma diminuição na contagem do tratamento T2, cerca de 0,7 ciclos log, contudo, logo retornou a se multiplicar e, em 60 dias de maturação, apresentou contagens finais de $8,49 \pm 0,02$ log UFC.g⁻¹ de queijo. Também foi observado um declínio na contagem do tratamento T1, de 0,5 ciclos log, e em seguida um aumento para $8,92 \pm 0,06$ log UFC.g⁻¹ em 60 dias de maturação.

Apesar de não ter sido observada diferença nas contagens iniciais de bactérias lácticas totais e *E. faecium*, ao longo da maturação foi constatada que o tratamento T2, que contém extrato de cúrcuma, apresentou contagens menores comparado ao queijo sem extrato de cúrcuma (T1), o que pode ser um indício de uma inibição por parte da cúrcuma.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de pH e acidez titulável do Controle e dos tratamentos T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30, 45 e 60 dias de maturação.

Houve um decréscimo de pH, nos três tratamentos, durante todo o período de maturação, apresentando valores médios de 4,73 a 4,82 a partir de 14 dias. Furtado (2005) menciona que o queijo Minas Padrão maturado no mínimo 20 dias deve apresentar o pH entre 5,0 e 5,1 para uma umidade entre 46 a 49 %. Candioti et al. (2002), encontrou valores entre 5,15 a 5,17 em queijos sem embalagem adicionados de *L. helveticus*, com umidade de 35 a 36 %, aos 180 dias de maturação.

A acidez titulável inicial estava entre 0,27 a 0,39 g ácido láctico.100 g⁻¹, valores próximos àquele encontrado por Machado et al. (2004), de 0,28 ± 0,08 g ácido láctico.100 g⁻¹. Durante o período de maturação, a acidez dos três tratamentos apresentou um aumento significativo em relação aos valores iniciais, alcançando em torno de 1,3 g ácido láctico.100 g⁻¹, com 30 dias, e apresentando uma diminuição a partir de 45 dias, se estabilizando em torno de 1,0 g ácido láctico.100 g⁻¹. Esses valores são maiores do que os encontrados por Martins (2014), que foram de 0,45 a 0,50 g ácido láctico.100 g⁻¹, e pode explicar as quedas nas contagens com 30 dias de maturação.

Tabela 7 - Valores de pH e acidez titulável do Controle e dos tratamentos T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30, 45 e 60 dias de maturação

Parâmetro	Tratamentos	Tempo de Maturação (dias)					
		0	7	14	30	45	60
pH	C	4,77 ± 0,08 ^{Ba}	4,86 ± 0,04 ^{Ba}	4,73 ± 0,04 ^{Aa}	4,73 ± 0,04 ^{Aa}	4,64 ± 0,20 ^{Aa}	4,65 ± 0,22 ^{Aa}
	T1	5,05 ± 0,08 ^{Aa}	5,10 ± 0,01 ^{Aa}	4,82 ± 0,06 ^{Aab}	4,82 ± 0,06 ^{Aab}	4,63 ± 0,19 ^{Ab}	4,67 ± 0,22 ^{Ab}
	T2	4,72 ± 0,15 ^{Ba}	5,00 ± 0,08 ^{Aa}	4,79 ± 0,06 ^{Aa}	4,79 ± 0,06 ^{Aa}	4,64 ± 0,21 ^{Aa}	4,72 ± 0,19 ^{Aa}
Acidez titulável (g ácido láctico.100 g ⁻¹)	C	0,39 ± 0,00 ^{Ac}	0,85 ± 0,25 ^{Ab}	0,90 ± 0,07 ^{Ab}	1,29 ± 0,09 ^{Aa}	1,06 ± 0,12 ^{Aab}	0,94 ± 0,10 ^{Aab}
	T1	0,27 ± 0,01 ^{Ac}	0,83 ± 0,01 ^{Ab}	0,98 ± 0,06 ^{Ab}	1,28 ± 0,14 ^{Aa}	0,99 ± 0,18 ^{Ab}	0,96 ± 0,01 ^{Ab}
	T2	0,31 ± 0,01 ^{Ad}	0,81 ± 0,08 ^{Ac}	1,17 ± 0,11 ^{Aab}	1,27 ± 0,05 ^{Aa}	1,10 ± 0,13 ^{Aab}	0,95 ± 0,07 ^{Abc}

Média ± desvio padrão (n=3);

A, B – letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

a, b – letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

C: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*; T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

5.3 TEOR DE CURCUMINA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO

As concentrações de curcumina na cúrcuma e no tratamento T2, durante o período de maturação, estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração de curcumina na cúrcuma moída comercial e no tratamento T2 com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação

Tratamentos	Curcumina* (g.100 g ⁻¹ amostra em base seca)
Cúrcuma moída	2,999 ± 0,033 ^a
T2 0	0,005 ± 0,000 ^c
T2 14	0,005 ± 0,000 ^c
T2 30	0,010 ± 0,000 ^b
T2 60	0,010 ± 0,000 ^b

Média ± desvio padrão (n=4) seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

*Pigmentos curcuminóides expressos como curcumina, em base seca;

T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

A média de concentração de curcumina na cúrcuma moída comercial (2,99 ± 0,03 g.100 g⁻¹) foi mais baixa do que a encontrada por Souza e Glória (1998), que avaliaram rizomas cultivados em várias regiões de Minas Gerais, e encontraram um valor médio de 4,41 ± 1,17 g.100 g⁻¹ de amostra. Cultivares da Índia, segundo a FAO (2004), apresentam concentrações entre 4,0 a 7,9 g.100 g⁻¹.

As amostras de queijo apresentaram teor de 0,005 ± 0,000 g.100 g⁻¹ amostra, em base seca, após um dia de fabricação, e com 60 dias de maturação apresentaram teor ligeiramente maior (p<0,05), com 0,01 ± 0,00 g.100 g⁻¹. Esse resultado já era o esperado, porque quando ocorre a diminuição da umidade do produto, conseqüentemente há uma concentração dos componentes. Esse efeito do aumento do teor de curcumina, também pode ser observado na intensificação da cor amarela no produto, na Tabela 9, como será discutindo posteriormente.

Levando em consideração a ingestão máxima diária aceitável para a curcumina (0,0001 g.kg⁻¹ peso corporal), logo, uma pessoa de 50 kg poderia consumir até 90,9 g desse queijo por dia e estaria ingerindo 0,005 g, ou seja, fica evidente que o queijo com cúrcuma, consumido até essa quantidade, não se torna tóxico a quem o ingerir.

Gutierrez et al. (2011) adicionou curcumina ao iogurte e testou em ratos diabéticos, por 31 dias, nas concentrações entre 0,015 a 0,09 g.kg⁻¹ peso

corporal/dia, e concluiu que quanto maior a concentração de curcumina, melhor é a ação anti-diabética.

5.4 COR

Os valores de L^* , a^* e b^* , até 60 dias de maturação, são apresentados na Tabela 9. Para o parâmetro L^* (0 = preto e 100 = branco), as amostras mantiveram-se entre 85,0 e 89,0 durante 60 dias de maturação. Normalmente, em queijos maturados sem embalagem, ocorre redução nos valores de L^* , ocasionada pela constante secagem até formação da casca (TOLENTINO, 2013). Nessa pesquisa, os queijos foram embalados a vácuo logo após 12 dias de secagem, mantendo alta luminosidade e sem formação de casca.

Tabela 9 - Componentes L^* , a^* e b^* , para o Controle, T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação

Tratamentos	L^*	a^*	b^*
C 0	89,10 ± 0,45 ^{ab}	-2,03 ± 0,05 ^e	15,41 ± 0,54 ^{hi}
C 14	85,54 ± 0,53 ^{cd}	-2,09 ± 0,08 ^e	19,59 ± 0,26 ^{ef}
C 30	84,93 ± 1,53 ^d	-1,63 ± 0,20 ^{bcde}	16,84 ± 0,63 ^{fgh}
C 45	85,75 ± 1,40 ^{bcd}	-1,75 ± 0,19 ^{cde}	17,26 ± 0,86 ^{efgh}
C 60	88,37 ± 0,20 ^{abcd}	-1,89 ± 0,07 ^{de}	16,83 ± 1,07 ^{fgh}
T1 0	86,14 ± 0,11 ^{bcd}	-1,09 ± 0,17 ^{ab}	12,86 ± 0,17 ⁱ
T1 14	86,23 ± 0,91 ^{bcd}	-1,29 ± 0,17 ^{abc}	16,53 ± 0,04 ^{gh}
T1 30	89,85 ± 0,25 ^a	-0,98 ± 0,05 ^a	19,19 ± 0,45 ^{efg}
T1 45	88,35 ± 1,75 ^{abcd}	-1,44 ± 0,08 ^{abcd}	20,04 ± 1,38 ^e
T1 60	88,33 ± 2,27 ^{abcd}	-1,43 ± 0,06 ^{abcd}	19,97 ± 1,07 ^e
T2 0	85,88 ± 0,22 ^{bcd}	-6,64 ± 0,12 ^f	26,33 ± 0,46 ^d
T2 14	86,52 ± 0,56 ^{abcd}	-7,69 ± 0,23 ^g	32,20 ± 0,14 ^c
T2 30	89,16 ± 0,22 ^{ab}	-7,74 ± 0,40 ^g	44,10 ± 0,68 ^a
T2 45	85,26 ± 0,30 ^{cd}	-7,72 ± 0,13 ^g	40,38 ± 1,15 ^b
T2 60	88,66 ± 2,29 ^{abc}	-7,87 ± 0,34 ^g	42,98 ± 2,24 ^{ab}

Média ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$);

L^* (0 = preto e 100 = branco); a^* (vermelho (+) e (-) verde); b^* (amarelo (+) e (-) azul);

C: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*; T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

O Controle e o tratamento T1 não apresentaram variação nos valores do componente a^* (vermelho (+) e (-) verde), no período de 60 dias de maturação. Já no tratamento T2, a cúrcuma promoveu um aumento da cor verde, com valores significativamente menores ($p < 0,05$).

Para o componente b^* (amarelo (+) e (-) azul), a partir de 14 dias, a amostra Controle não apresentou variação ($p > 0,05$), o contrário do observado para T1, onde houve variação a partir do mesmo período. Contudo, para a amostra com cúrcuma (T2), pode-se observar que houve uma intensificação na cor amarela durante a maturação, significativamente diferente comparada ao tempo 0 (dia após a produção), o que também foi observado por Licón et al. (2012a).

5.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A cúrcuma moída apresentou um conteúdo de compostos fenólicos de 1861,36 mg equivalentes de ácido gálico (EAG).100 g⁻¹ (base seca) (Tabela 10). Para os queijos T2, o teor de fenólicos foi superior aos outros queijos, porém inferior à curcuma moída. Isso é justificado pela quantidade de cúrcuma adicionada ao leite e pela perda que ocorre no soro durante a produção do queijo.

A atividade antioxidante da cúrcuma por seqüestro dos radicais DPPH⁺ foi de 42,48 µmol Trolox.g⁻¹, por seqüestro de radicais ABTS⁺ de 38,69 µmol Trolox.g⁻¹ e o poder de redução pelo método de FRAP de 44,78 µM Sulfato Ferroso.g⁻¹.

Para os queijos do tratamento T2, os valores obtidos para a atividade antioxidante passaram a ser significativamente diferentes apenas com 60 dias de maturação ($0,94 \pm 0,01$ µmol Trolox.g⁻¹). Para o método de ABTS⁺, foi observada diferença a partir de 30 dias, com valor máximo obtido de $4,18 \pm 0,04$ µmol E Trolox.g⁻¹. Já para o método de FRAP não ocorreram diferenças significativas entre as amostras com e sem cúrcuma, em todo o período. Essas diferenças entre os métodos, segundo Zhang et al. (2012), são devidas aos diferentes mecanismos químicos, que não tem correlação entre si.

Tabela 10 - Valores para compostos fenólicos e capacidade antioxidante por DPPH⁺, ABTS⁺ e FRAP, da cúrcuma moída e do Controle, T1 e T2 com 0 (dia após a produção), 14, 30, 45 e 60 dias de maturação

Tratamentos	Fenólicos (mg EAG.100g ⁻¹)	DPPH ⁺ (μmol Trolox.g ⁻¹)	ABTS ⁺ (μmol Trolox.g ⁻¹)	FRAP (μM Sulfato Ferroso.g ⁻¹)
Cúrcuma moída	1861,36 ± 107,96 ^a	42,48 ± 0,21 ^a	38,69 ± 0,43 ^a	44,78 ± 1,09 ^a
C 0	54,16 ± 1,29 ^{de}	0,09 ± 0,00 ^d	1,23 ± 0,14 ^h	0,58 ± 0,05 ^b
C 14	38,54 ± 1,07 ^{de}	0,08 ± 0,01 ^d	1,70 ± 0,07 ^{dfg}	0,51 ± 0,02 ^b
C 30	35,21 ± 1,50 ^{de}	0,08 ± 0,01 ^d	1,92 ± 0,04 ^{df}	0,52 ± 0,03 ^b
C 45	34,68 ± 1,50 ^{de}	0,09 ± 0,03 ^d	1,92 ± 0,03 ^f	0,53 ± 0,04 ^b
C 60	45,59 ± 1,50 ^{de}	0,10 ± 0,03 ^d	2,05 ± 0,00 ^d	0,61 ± 0,04 ^b
T1 0	39,07 ± 1,82 ^{de}	0,09 ± 0,01 ^d	1,22 ± 0,04 ^h	0,51 ± 0,02 ^b
T1 14	28,34 ± 1,13 ^{de}	0,14 ± 0,02 ^d	1,41 ± 0,02 ^{gh}	0,60 ± 0,07 ^b
T1 30	26,26 ± 1,39 ^e	0,12 ± 0,02 ^d	1,59 ± 0,02 ^{fgh}	0,64 ± 0,06 ^b
T1 45	31,53 ± 1,02 ^{de}	0,13 ± 0,01 ^d	1,66 ± 0,05 ^{dfg}	0,77 ± 0,13 ^b
T1 60	41,27 ± 1,29 ^{de}	0,12 ± 0,03 ^d	1,90 ± 0,09 ^{df}	0,61 ± 0,02 ^b
T2 0	77,29 ± 0,96 ^{cde}	0,31 ± 0,03 ^{cd}	3,03 ± 0,11 ^d	0,93 ± 0,02 ^b
T2 14	108,93 ± 1,39 ^{bcd}	0,38 ± 0,01 ^{cd}	3,14 ± 0,12 ^d	1,05 ± 0,03 ^b
T2 30	127,88 ± 0,63 ^{bc}	0,36 ± 0,06 ^{cd}	3,71 ± 0,26 ^c	1,18 ± 0,05 ^b
T2 45	168,52 ± 0,76 ^b	0,60 ± 0,33 ^c	4,05 ± 0,01 ^{bc}	1,20 ± 0,06 ^b
T2 60	174,29 ± 0,46 ^b	0,94 ± 0,01 ^b	4,18 ± 0,04 ^b	1,11 ± 0,03 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, p≤0,05);

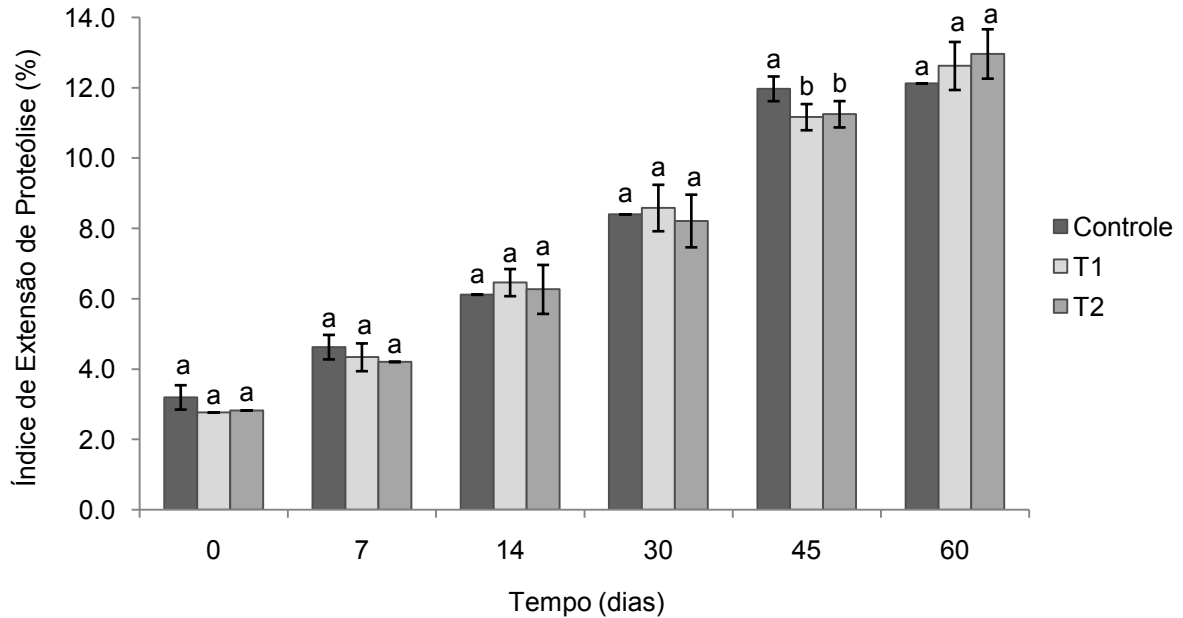
EAG: Equivalente de ácido gálico; C: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*; T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

5.6 EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE

5.6.1 Índice de Extensão e Profundidade da Proteólise

A variação de extensão de proteólise dos queijos com 0, 7, 14, 30, 45 e 60 dias de maturação está representada na Figura 6. O índice de extensão mede o nitrogênio solúvel em pH 4,6, o que inclui peptídeos de alta, média e baixa massa molecular e aminoácidos livres, obtidos pela proteólise primária conduzida por resíduos de quimosina e plasmina (MACEDO, MALCATA, 1997; FURTADO, 2011).

Figura 6 - Variação do índice de extensão da proteólise de queijo Minas Curado com até 60 dias de maturação do Controle e dos tratamentos T1 e T2



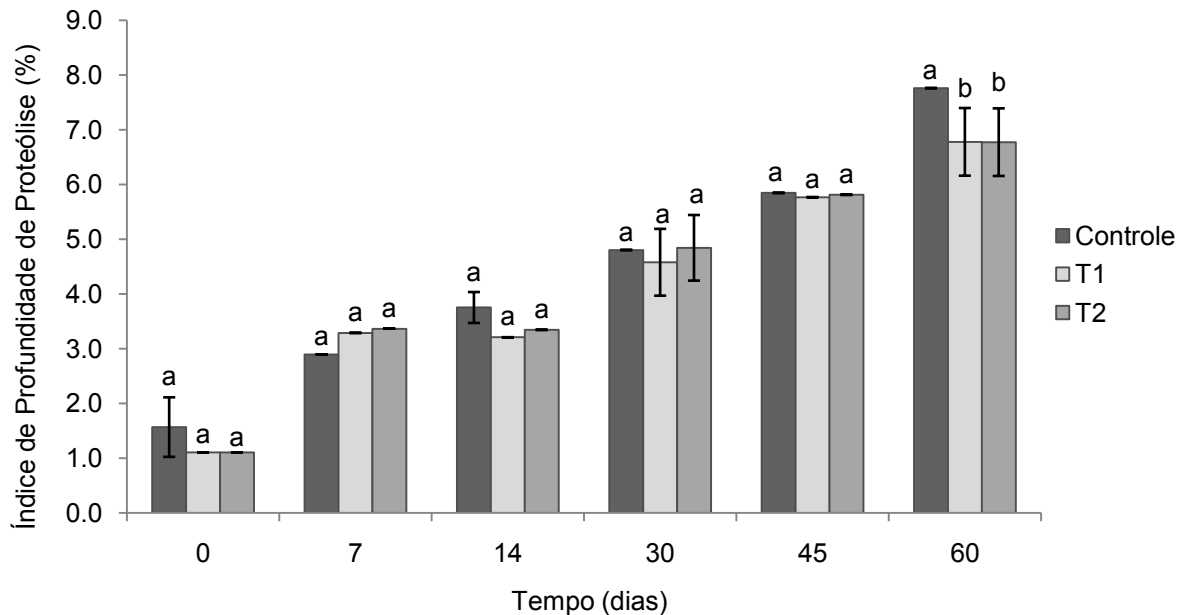
Média \pm desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes entre os tratamentos, para cada tempo, indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$);
 Controle: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*;
 T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

Observa-se que o conteúdo de nitrogênio solúvel em pH 4,6 dos tratamentos T1 e T2 não diferiu ($p > 0,05$) do Controle durante os 30 dias de maturação. Entretanto, aos 45 dias de maturação, o Controle apresentou diferença significativa em relação aos queijos T1 e T2. Aos 60 dias de maturação, entretanto, os três tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas ao nível de 5% ($p > 0,05$). Martins (2014), utilizando coagulante líquido microbiano (*Aspergillus niger* var. *awamori*), obteve em torno de 14% de extensão de proteólise em queijo tipo Minas Padrão maturado por 45 dias, valores estes superiores ao encontrados neste estudo.

Na Figura 7 está apresentada a variação da profundidade de proteólise durante o período de maturação. A profundidade de maturação, avaliada pela relação de nitrogênio solúvel em TCA 12% / NT, é mais influenciada pela atividade das endoenzimas e exoenzimas das culturas lácticas empregadas na fabricação do queijo e de possíveis contaminantes. São computados peptídeos com

comprimento de cadeia entre 2 e 20 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres, obtidos da proteólise secundária (FURTADO, 2008; FURTADO, 2011).

Figura 7 - Variação do índice de profundidade da proteólise de queijo Minas Curado até 60 dias de maturação dos tratamentos Controle, T1 e T2



Média \pm desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes entre os tratamentos, para cada tempo, indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$);
 Controle: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*;
 T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

Não houve diferença significativa entre os queijos com até 45 dias de maturação, entretanto com 60 dias, o Controle diferiu entre as amostras ($p < 0,05$). Em queijo de massa cozida, maturado por 90 dias, Milesi et al., (2011) observaram uma profundidade da proteólise em torno de 6,5 % para duas cepas de *L. helveticus* utilizadas.

Embora diversas linhagens de *L. helveticus* têm demonstrado possuir um sistema proteolítico altamente eficiente quando comparado a outras bactérias ácido lácticas (VALENCE et al., 2000; GRIFFITHS, TELLEZ, 2013; SAHINGIL et al., 2014), não foi observada essa distinção na linhagem em estudo. O comportamento não diferenciado ao final da maturação pode ter sido ocasionado pela queda da contagem de bactérias lácticas totais em MRS, depois de 14 dias, como observado na Figura 5 **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, maior

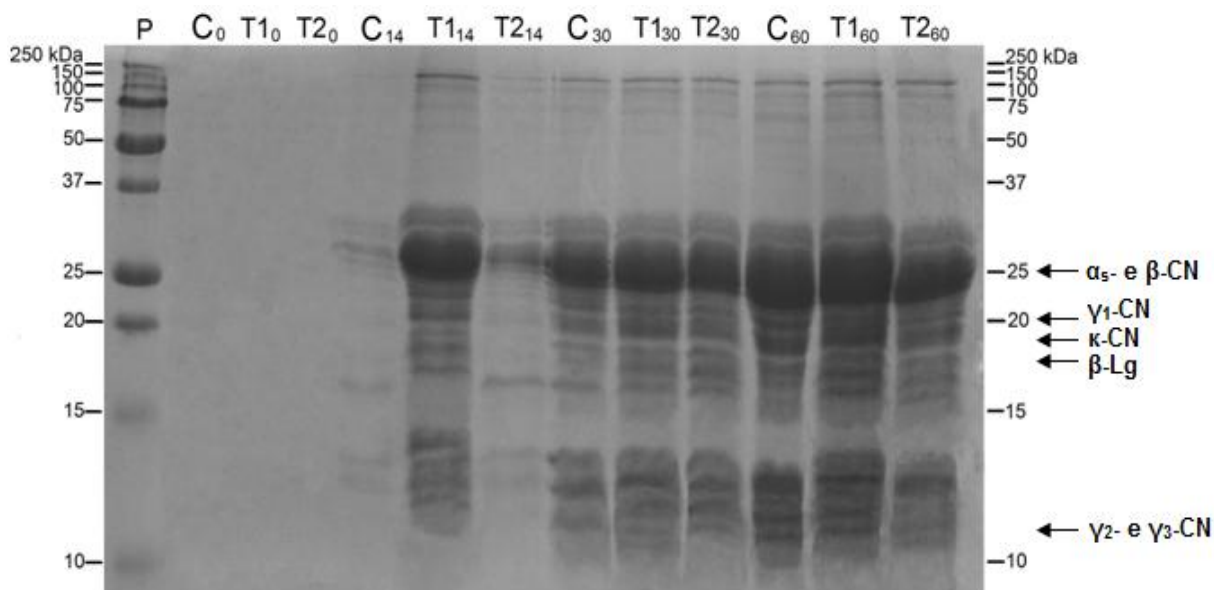
percentagem de sal nesses queijos e/ou pelos baixos valores de pH, fazendo com que as proteases do leite e microbianas apresentassem baixa atividade (OLARTE et al., 2000). Além disso, essa distinção varia muito de uma linhagem para outra (MILESI et al., 2011) e essa espécie é comumente empregada em queijos de massa cozida.

L. helveticus diferenciam-se não apenas na intensidade da sua atividade caseinolítica, mas também na especificidade de suas endopeptidases (JENSEN et al., 2009), como foi observado por Matar et al. (1997), que verificou que leite fermentado com *L. helveticus* R389 produziu peptídeos bioativos, enquanto que a cepa L89 não apresentou tal capacidade proteolítica.

5.5.2 Perfil eletroforético por SDS-PAGE

O perfil eletroforético do Controle e dos tratamentos T1 e T2, durante a maturação está representado na Figura 8.

Figura 8 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do Controle (C) e dos tratamentos T1 e T2, com 0 (dia após a produção), 14, 30 e 60 dias de maturação



P: padrão de 250 kDa a 10 kDa;

C: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*;

T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma;

CN: caseína; Lg: lactoglobulina.

A banda de alta intensidade em torno de 25 kDa representa as α_s - e β -caseínas. Bandas entre 20-18 kDa podem indicar a presença de γ_1 -caseína, κ -caseína e β -Lactoglobulina, e entre 11-12 kDa podem indicar presença de γ_2 - e γ_3 -caseínas. Como não houve presença de bandas de 14 kDa, parece ter havido ausência de α -lactoalbumina (FOX et al., 2000; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; FALEIRO, 2013; PAUL et al., 2014; MIYAMOTO et al., 2015).

Bandas em torno de 16 kDa estão relacionadas à para- κ -caseína (FALEIRO, 2013; PAUL et al., 2014; MIYAMOTO et al., 2015). Segundo Damodaran, Parkin, Fennema et al. (2010), a para- κ -caseína é decorrente da hidrólise da κ -caseína, na ligação Fen105-Met106, pela ação da quimosina, não sendo hidrolisada durante a maturação (SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001).

Qualquer banda na faixa de 30 a 60 kDa são assumidas como de microrganismos, uma vez que o perfil eletroforético do leite não contém proteínas nessa faixa (VALENCE et al., 2000). O restante das bandas é assumido como produtos de degradação.

No tempo 0 (dia após a produção), foi observado que não houve nenhuma banda aparente para os três tratamentos. Como o tempo era insuficiente para ocorrer proteólise, as proteínas ainda não se apresentavam solúveis em água.

A partir de 14 dias, foi observado que houve hidrólise das proteínas, permitindo a solubilização destas e aparecimento no gel. Houve uma diferenciação na intensidade das bandas entre os tratamentos, em 14 dias, tendo o tratamento T1 apresentado maior quantidade e intensidade de bandas, indicando maior proteólise.

A partir de 30 dias de maturação, os três tratamentos apresentaram acentuação e progressão na proteólise, com bandas de alta intensidade entre 23 a 31 kDa, como foi observado por Kirmaci et al. (2014), e formação de bandas de baixa massa molecular, entre 10 e 15 kDa, que correspondem a produtos de degradação (PAUL et al., 2014).

Aos 60 dias, as amostras apresentaram perfis peptídicos similares às amostras no tempo 30 dias, porém com intensidade acentuada e maior quantidade de bandas para o tratamento T1, contendo *L. helveticus*. Apesar de fragmentos de peptídeos menores do que 10 kDa poderem estar presentes, a técnica utilizada nesse estudo não permitiu detectá-los.

Bandas entre 75 a 150 kDa, aparentes a partir de 14 dias de maturação, não apresentaram hidrólise ao fim de 60 dias, indicando que não houve ação enzimática sobre essas proteínas.

Moatsou et al. (2002) observaram em queijo Feta, por método eletroforético na presença de uréia (UREIA-PAGE), que a banda de β -caseína mantinha-se constante durante o período de maturação e, em alguns casos, aumentava, provavelmente devido à acumulação de produtos de hidrólise nesta área. Também observaram que a área de γ -caseínas não foi notavelmente alterada, aparentemente devido ao pH do queijo desfavorável à atividade da plasmina.

Segundo autores, a maioria dos peptídeos produzidos solúveis em água é originada a partir da α_S -caseína, devido à ação de coalho que avança rapidamente durante o período de maturação (MOATSOU et al., 2002; KIRMACI et al., 2014). Segundo Sihufe et al. (2010), este comportamento é comum na maioria dos queijos, onde a atividade do coagulante residual é mais importante do que a atividade da plasmina.

5.7 CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos atenderam aos padrões exigidos pela Resolução RDC nº 12 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001a) não oferecendo riscos aos provadores.

Levando em consideração que o queijo Minas Curado é aquele maturado por no mínimo 20 dias (FURTADO, 2005), o teste de análise sensorial foi aplicado nesse período, pois o objetivo era verificar se haveriam diferenças significativas nos atributos sensoriais dos queijos probióticos adicionados de extrato de cúrcuma com os não adicionados, e não avaliar os atributos que proporciona a maturação com *L. helveticus* cujos efeitos podem afetar a percepção por parte de julgadores não treinados.

Os escores de avaliação sensorial dos três tratamentos (Controle, T1 e T2), com 20 dias de maturação, constam na Tabela 11. As notas hedônicas dos atributos situaram-se em torno de 6 (gostei ligeiramente) e 7 (gostei), indicando que os três tratamentos foram aceitos. Não houveram diferenças de aceitação ($p > 0,05$) entre o Controle e T1 quanto aos atributos avaliados. O queijo

adicionado de extrato de cúrcuma (T2) foi o menos apreciado em relação à aparência, aroma e sabor, o que refletiu na aceitação global, contudo, ainda assim apresentou uma boa aceitação.

Tabela 11 - Escores de avaliação sensorial do Controle e dos tratamentos T1 e T2, para os atributos aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global, com 20 dias de maturação

Tratamentos	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação global
Controle	7,57 ± 1,15 ^a	7,16 ± 1,31 ^a	7,55 ± 1,32 ^a	7,23 ± 1,53 ^a	7,51 ± 1,13 ^a
T1	7,63 ± 1,19 ^a	6,98 ± 1,41 ^a	7,58 ± 1,29 ^a	7,27 ± 1,49 ^a	7,48 ± 1,12 ^a
T2	5,91 ± 1,92 ^b	6,34 ± 1,64 ^b	6,28 ± 2,09 ^b	6,90 ± 1,67 ^a	6,44 ± 1,64 ^b

Escala hedônica de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo);

Média de 98 julgadores;

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$);

Controle: queijo com cultura *starter* MW 031 R; T1: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium*;

T2: queijo com culturas de *L. helveticus* e *E. faecium* e extrato de cúrcuma.

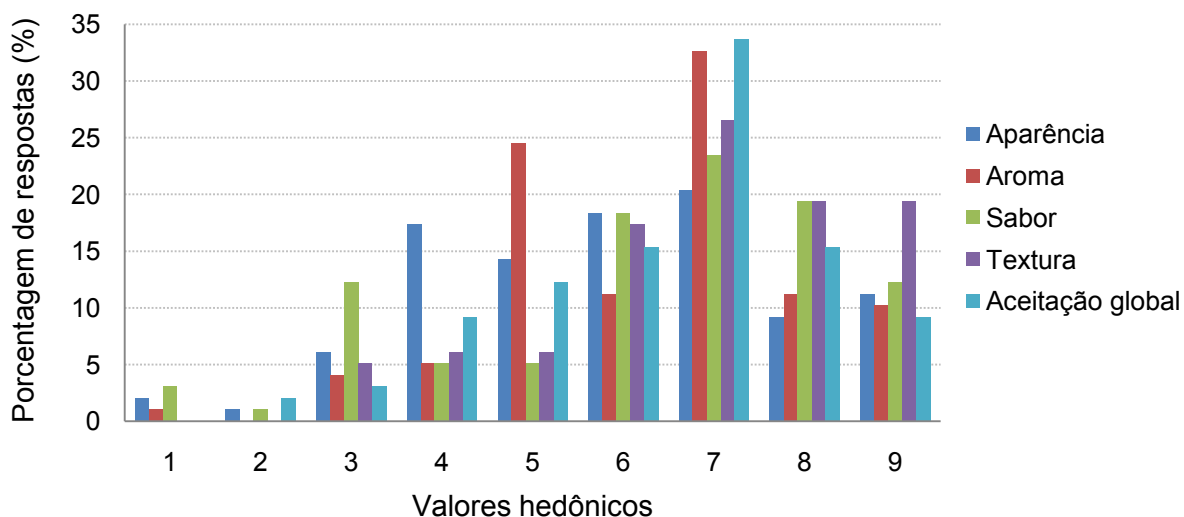
Segundo Faria et al. (2006), Dender (2008) e Fortin et al. (2011), um queijo probiótico deve apresentar as mesmas qualidades sensoriais de um queijo convencional, ou seja, a adição de culturas probióticas não deve causar qualquer perda de qualidade. Gardiner et al. (1999), que avaliaram a adição do *E. faecium* em queijo Cheddar e concluíram que a linhagem não afetou a aparência, o aroma e nem a textura do produto, não apresentando diferenças significativas quando comparado ao queijo controle adicionado somente de cultura *starter*, como foi observado nesse estudo, então, dessa forma, os atributos do tratamento T2 foram menos apreciados devido à adição de extrato de cúrcuma.

Os atributos do tratamento T2, principalmente a aparência, possivelmente foram menos apreciados porque a população brasileira não tem o hábito de consumir cúrcuma, assim como queijos com forte intensidade da cor amarela. Uma alternativa para tentar mascarar a cor seria maturar os queijos sem embalagens, porque dessa forma obter-se-ia queijos mais secos e com casca, com coloração amarelo palha típico de queijos maturados. Outra opção seria acrescentar especiarias à massa do queijo ou até mesmo recobrir a superfície dos queijos com condimentos (TOLENTINO, 2013).

Avaliando-se pela porcentagem de julgadores para aceitação do tratamento T2 (Figura 9), o atributo textura obteve maior média, $6,90 \pm 1,67$, onde

82,66 % dos julgadores atribuíram notas entre 6 (gostei ligeiramente) a 9 (gostei muitíssimo). Para o atributo aparência ($5,91 \pm 1,92$), somente 40,81 % dos julgadores atribuíram notas entre 7 (gostei) a 9 (gostei muitíssimo) e 26,53 % notas entre 1 (desgostei muitíssimo) a 4 (desgostei ligeiramente). Apesar disso, uma grande parte dos julgadores (73,47 %) atribuíram notas entre 6 a 9 para o atributo aceitação global. No requisito indiferença, o aspecto mais proeminente foi o aroma, com 24,49 %.

Figura 9 - Porcentagem de julgadores para aceitação de queijo adicionado de *E. faecium* e *L. helveticus* adicionado de extrato de cúrcuma (T2), por meio de teste sensorial de aceitação com escala hedônica de 9 pontos



Escala hedônica de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo);

6 CONCLUSÃO

A adição de extrato de cúrcuma ao queijo não alterou a composição centesimal e não prejudicou a viabilidade celular do *E. faecium*, contribuiu no aumento do teor de compostos fenólicos do produto e o queijo obteve uma nota média satisfatória no teste de aceitação sensorial. Portanto, o queijo adicionado de *E. faecium*, *L. helveticus* e extrato de cúrcuma apresentou propriedades nutritivas e microbiológicas satisfatórias e aumento na atividade antioxidante com potencial para promoção da saúde.

BIBLIOGRAFIA

- AHN, Y. T. *et al.* Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 303–311, 2003.
- AKINOLA, A. A.; AHMAD, S.; MAZIAH, M. Total antioxidant capacity, total phenolic compounds and the effects of solvent concentration on flavonoid content in *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza* rhizomes. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 2, p. 3–6, 2014.
- ALVES, G. **Parâmetros físico-químicos envolvidos na padronização e no rendimento de queijo Prato: modelagem matemática**. 1995. 136 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Londrina - UEL, Londrina, PR, 1995.
- ALVIS, A.; ARRAZOLA, G.; MARTINEZ, W. Evaluación de la actividad y el potencial antioxidante de extractos hidro-alcohólicos de cúrcuma (*Curcuma longa*). **Información tecnológica**, v. 23, n. 2, p. 11–18, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, MD: [s.n.], 1995.
- AXELSSON, L. **Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3 ed. Revi. Nova York: Marcel Dekker: [s.n.], 1998.
- BARANKEVICZ, G. B. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**. 2015. 54 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2015.
- BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1–12, 1992.
- BARROS, C. M. V. *et al.* Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo Prato light. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 11–18, 2006.
- BEGANOVIC, J. *et al.* Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. **Anaerobe**, v. 20, p. 58–64, 2013.
- BIOPEP. Bioactive peptides. 2015. Disponível em: <<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988**. Diário Oficial da União. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2d98d4804745761d8413d43fbc4c6735/Resolucao_04_1988.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 12 nov. 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para

alimentos. **Diário Oficial da União**, 2001a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18 de julho de 2008. Lista de alegações de propriedade funcional. **Diário Oficial da União**, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 39, de 21 de março de 2001. Tabela de valores de referência para porções de alimentos e bebidas embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, 1996.

CANDIOTI, M. C. *et al.* Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 11, p. 923–931, 2002.

CARPINO, S. *et al.* Volatile fingerprint of Piacentinu cheese produced with different tools and type of saffron. **Small Ruminant Research**, v. 79, p. 16–21, 2008.

CELIBERTO, L. S. **Efeito de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos**. 2014. 105 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara - SP, 2014.

CHARTERIS, W. P. *et al.* Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123–136, 1998.

CHAVES-LÓPEZ, C. *et al.* Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. **Food microbiology**, v. 42, p. 117–21, 2014.

CHEN, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6680–6692, 2014.

CHUNG, Y.-C. *et al.* Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 improves cognitive functioning during cognitive fatigue tests in healthy older adults. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 465–474, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. In: **Características do leite**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed: [s.n.], 2010.

DENDER, A. G. Prebióticos e probióticos em queijos. I **Simpósio Internacional: Prebióticos e Probióticos em Produtos Lácteos**, 2008.

FALEIRO, A. S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia**. 2013. 71 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BH, 2013.

FARIA, C. P.; DOMINGOS, H.; GUERROUE, J. L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 511–516, 2006.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 2004.

FILHO, A. B. C. et al. Cúrcuma: planta medicinal condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171–175, 2000.

FILHO, C. R. M. S. *et al.* Potencial condimentar da *Curcuma longa* L.: estudo da estabilidade da oleoresina de cúrcuma em diferentes temperaturas. **5º Simposio de Segurança Alimentar**, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants FAO/WHO Expert committee report on food additives. **Technical Report Series 789**, p. 44, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Turmeric: Post-harvest Operations**. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compedium_-_Turmeric.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2015.

FORTIN, Marie-Hélène et al. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 75–82, 2011.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry: proteins**. v. 1. London: Blackie Academic & Professional: [s.n.], 1997.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers: [s.n.], 2000.

FURTADO, M. M. **Queijos com Olhaduras**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda.: [s.n.], 2007.

FURTADO, M. M. **Queijos Duros**. v. 1. São Paulo: Setembro: [s.n.], 2011.

FURTADO, M. M. **Quesos típicos de Latinoamérica**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda.: [s.n.], 2005.

FURTADO, M. R. A. **Caracterização histórico, tecnologia de fabricação, características físico-químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo Reino**. 2008. 83 fls. Tese (Doutorado em Ciência dos

Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2008.

GARCÍA, V. et al. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. **Dairy Science and Technology**, v. 92, p. 691–707, 2012.

GARDINER, G. et al. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2192–2199, 1998.

GARDINER, G. E. et al. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4907–16, 1999.

GIRAFFA, G. *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 4–5, 2014.

GOMEZ, M. J. et al. Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 289–297, 1997.

GONZÁLEZ, K. N. D. et al. The antihypertensive effect of fermented milks. **Revista Argentina de microbiología**, v. 46, n. 1, p. 58–65, 2014.

GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric-chemistry, technology and quality. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 12, p. 199–301, 1980.

GRIFFITHS, M. W.; TELLEZ, A. M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 30, p. 9, 2013.

GUEIMONDE, M. et al. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 467–471, 2006.

GUIDONE, A. et al. Effect of adjuncts on microbiological and chemical properties of Scamorza cheese. **Journal Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1467–1478, 2015.

GUTIERRES, V. O. **Avaliação dos efeitos fisiológicos e bioquímicos do tratamento com curcumina incorporada ao iogurte no diabetes experimental**. 2011. 106 fls. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP, 2011.

HANNON, J. A. et al. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 316–327, 2007.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology**. Londres: Academic Press: [s.n.], 1976.

HAYALOGLU, A. A.; KARATEKIN, B.; GURKAN, H. Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure and functional properties. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 136–144, 2014.

HICKEY, D. K. et al. Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. **The Journal of dairy research**, v. 74, n. 1, p. 9–17, 2007.

HORNE, J. et al. Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 605–617, 2005.

HUANG, YI *et al.* Effect of orally administered *Enterococcus faecium* EF1 on intestinal cytokines and chemokines production of suckling piglets. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 81–84, 2012.

HUNG, P. V. et al. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 185–190, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008: [s.n.], 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Lactic Acid Starters - Standard of Identity, Standard n° 149**. Brussels: [s.n.], 1991.

JENSEN, M. P.; VOGENSEN, F. K.; ARDO, Y. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. 661–668, 2009.

KANAWJIA, S. K. et al. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 6, p. 577–583, 1995.

KIM, J.-E. et al. *Lactobacillus helveticus* suppresses experimental rheumatoid arthritis by reducing inflammatory T cell responses. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 350–362, 2015.

KINOUCI, F. L. “**logurte ” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama**. 2006. 84 fls. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara-SP, 2006.

KIRMACI, H. A. et al. Evolution of proteolysis in Urfa cheese made from ewe’s milk by wild type starter culture systems. **Small Ruminant Research**, v. 119, p. 120–129, 2014.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. **Journal of Functional Foods**, p. 177–187, 2009.

KRUIF, C. G. *et al.* Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171-172, p. 36–52, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 685–689, 1970.

LI, W. F. *et al.* Effect of *Enterococcus faecium* 1 (EF1) on antioxidant functioning activity of caco-2 cells under oxidative stress. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 13, p. 2307–2312, 2012.

LICÓN, C. C. et al. Chemical, microbiological, textural, color, and sensory characteristics of pressed ewe milk cheeses with saffron (*Crocus sativus* L.) during ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4263–74, 2012.

LICÓN, C. C. et al. Preliminary study of saffron (*Crocus sativus* L. stigmas) color extraction in a dairy matrix. **Dyes and Pigments**, v. 92, p. 1355–1360, 2012.

- LIONG, M. T. **Probiotics: biology, genetics and health aspects**. v. 21. [s.l.: s.n.], 2011.
- LIU, Z. et al. Synergistic effects of rhizoma paridis and rhizoma curcuma longa on different animal tumor models. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 31–40, 2014.
- LUQUET, F. M. **Leche y Productos Lacteos: la Leche de la Mama a la Lecheria**. v. 1. Zaragoza: Acribia: [s.n.], 1991.
- MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Secondary proteolysis in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. **Z. Lebensm Unters Forsh A.**, v. 204, p. 173–179, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002170050057>>.
- MACHADO, E. C. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516–521, 2004.
- MAENO, M.; YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of dairy science**, v. 79, p. 1316–1321, 1996.
- MAIA, N. B. et al. Influência de tipos de rizomas de multiplicação de curcuma. **Bragantia**, v. 54, n. 1, p. 33–37, 1995.
- MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafraão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 505–512, 2014.
- MARQUES, K. A.; SOARES, B. G. Características físico-químicas e sensoriais de queijo Minas Padrão probiótico. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 17–25, 2011.
- MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2 ed. Marcel Dekker: [s.n.], 2001.
- MARTINS, M. C. **Obtenção e avaliação de curcumina a partir de rizomas secos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. 1993. 176 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- MARTINS, V. S. **Efeito da redução do sódio nas características físico-químicas do queijo tipo Minas Padrão**. 2014. 56 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Londrina, PR, 2014.
- MATAR, C. et al. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease deficient derivative. **Journal of dairy science**, v. 80, p. 1965–1970, 1997.
- MAZUMDER, A. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 1165–1170, 1995.
- MICUCCI, M. et al. Curcuma longa L. as a therapeutic agent in intestinal motility disorders. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2013.

MILESI, M. M.; BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. **Food Research International**, v. 44, p. 765–773, 2011.

MILKPOINT. **Mercado global de queijos deve alcançar US\$ 118,44 bi até 2019.**

MIYAMOTO, M. et al. Distinctive proteolytic activity of cell envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* isolated from airag , a traditional Mongolian fermented mare's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 65–71, 2015.

MOATSOU, G. et al. Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. **Lait**, v. 82, p. 601–611, 2002.

NAGHETINI, C. C. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma.** 2006. 61 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143–148, 1999.

OLARTE, C. et al. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 421–429, 2000.

OTTE, J. et al. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 229–238, 2011.

PAUL, M. et al. Sensory and protein profiles of Mexican Chihuahua cheese. **Journal Food Science Technology**, v. 51, p. 3432–3438, 2014.

PEREIRA, R. C. A.; SANTOS, O. G. S. Plantas Condimentares: Cultivo e Utilização. **Documentos 161 - Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 56, 2013.

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

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Chronic diseases caused by chronic inflammation require chronic treatment: anti-inflammatory role of dietary spices. **Clinical & Cellular Immunology**, v. 5, n. 238, 2014.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ABRIOUEL, H. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1–7, 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. SUPPL. 2, p. 105–110, 2002.

ROBERT, M. C. et al. Identification of Angiotensin-I-Converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6923–6931, 2004.

ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação de queijo Minas Padrão.** 2004. 96 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2004.

ROSELINO, M. N. **Avaliação do simbiótico fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, à base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) no controle do diabetes mellitus**. 2012. 98 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara - SP, 2012, 2012.

ROSELINO, M. N. et al. A potential synbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats. **Lipids in health and disease**, v. 11, p. 114, 2012.

ROSSI, E. A. et al. Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 74, p. 209–16, 2000.

RUFINO, M. S. M. et al. on line. **Comunicado Técnico 125**, 2006. Disponível em: <file:///C:/Users/Katri Gasparin/Downloads/cot_125.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2015.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos : o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1–16, 2006.

SADAT-MEKMENE, L. et al. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1455–70, 2013.

SADAT-MEKMENE, L. et al. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 1–13, 2011.

SADAT-MEKMENE, L. et al. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α s1-casein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 179–186, 2011.

SAHINGIL, D. et al. Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 603–623, 2014.

SAITO, T et al. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1434–1440, 2000.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 133–139, 2005.

SANT’ANNA, G. S. **Efeito do extrato etanólico de *Curcuma longa* sobre a atividade da enzima histona desacetilase no processo de envelhecimento cerebral Gabriela**. 2012. 62 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2012.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **International journal of food microbiology**, v. 76, p. 93–105, 2002.

SATO, R. T. et al. Assessment of proteolysis and sensory characteristics of prato cheese with adjunct culture. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. Supl2, p. 3143–

3152, 2012.

SAZAWAL, S. et al. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, p. 374–82, 2006.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 23–43, 2000.

SENAN, S.; PRAJAPATI, J. B.; JOSHI, C. G. Whole-genome based validation of the adaptive properties of Indian origin probiotic *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 321–328, 2015.

SIHUFÉ, G. A. et al. Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 101–107, 2010.

SIVIERI, K. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 231–237, 2008.

SLATTERY, L. et al. Invited review: *Lactobacillus helveticus* - a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4435–4454, 2010.

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

SOUZA, C. R. A.; GLÓRIA, M. B. A. Chemical analysis of Turmeric from Minas Gerais, Brazil and comparison of methods for flavour free oleoresin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 2, p. 218–224, 1998.

SRIDHAR, V. R. et al. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3025–3032, 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* – the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63–68, 1959.

THIERRY, A. et al. Affinage de l'emmental: dynamique des populations bactériennes et évolution de la composition de la phase aqueuse. **Lait**, v. 78, p. 521–542, 1998.

TOLENTINO, M. C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo de massa semidura recoberto com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 2013. 120 fls. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2013.

TUOMILEHTO, J. et al. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. **Journal of human hypertension**, v. 18, p. 795–802, 2004.

TZANETAKIS, N.; VAFPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. **Food Microbiology**, v. 12, p. 55–63, 1995.

VALENCE, F. et al. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. **The Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 2, p. 261–71, 2000.

VALOR ECONÔMICO. **Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros**. 20 de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/agro/374044>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

WANG, J. et al. Fermentation characteristics and angiotensin I-converting enzyme – inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* isolate H9 in cow milk, soy milk, and mare milk. **Journal Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3655–3664, 2015.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, v. 51, p. 1–8, 1983.

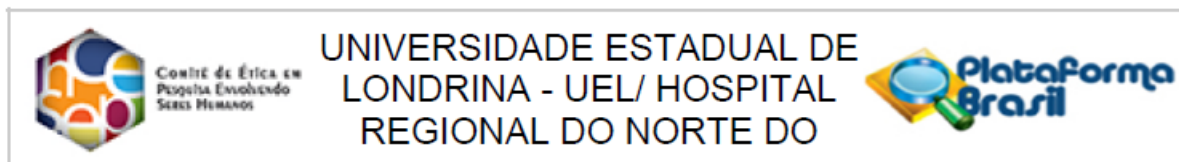
XU, J.-Y. et al. Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition**, v. 24, n. 10, p. 933–40, 2008.

ZHANG, X. et al. Chemical composition of 13 commercial soybean samples and their antioxidant and anti-inflammatory properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 40, p. 10027–10034, 2012.

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

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – UEL.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de queijo Minas Curado com adição de "Enterococcus faecium" EF 1, "Lactobacillus helveticus" LH 13 e cúrcuma.

Pesquisador: Sandra Garcia

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 21516213.6.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.036.296

Data da Relatoria: 27/04/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda do projeto: Identificação de peptídeos bioativos anti-hipertensivos em Queijo Minas curado adicionado de "Enterococcus faecium" e "Lactobacillus helveticus". Aprovado pelo CEP em 16/09/2013. Esta emenda refere-se ao desenvolvimento de um queijo Minas Curado por 60 dias adicionado cúrcuma moída, "E. faecium" e "L. helveticus", e avaliar o desenvolvimento da proteólise, através do peso molecular dos polipeptídios, utilizando o método SDS-PAGE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o perfil eletroforético de polipeptídios de queijo Minas Curado por 60 dias adicionado de "Enterococcus faecium" EF 1, "Lactobacillus helveticus" LH 13 e cúrcuma durante o período de maturação.

Objetivo Secundário: Avaliar a viabilidade do "E. faecium" e "L. helveticus" durante o período de maturação do queijo; Determinar os parâmetros físico-químicos das formulações durante sua maturação; Analisar o peso molecular de polipeptídios hidrolisados durante o período de maturação, utilizando o método SDS-PAGE; Avaliar o desempenho sensorial do produto final com adição de "E. faecium", "L. helveticus" e cúrcuma, comparado ao queijo adicionado apenas de cultura "starter".

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

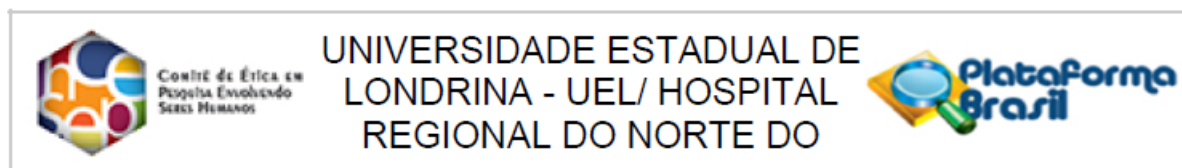
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.036.296

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Aumento da velocidade do trânsito intestinal.

Benefícios: Através do consumo continuado do produto espera-se a prevenção da constipação intestinal, manutenção do nível de colesterol sérico, prevenção de doenças crônico degenerativas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante para área uma vez que se propões estudar os efeitos à promoção da saúde, manutenção do nível de colesterol sérico e a prevenção de doenças crônico degenerativas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão ok.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador respondeu as pendências solicitadas, portanto o projeto está aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

LONDRINA, 27 de Abril de 2015

Assinado por:
Paula Mariza Zedu Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B - Modelo de ficha para a coleta de dados do provador.**COLETA DE DADOS DO PROVADOR**

Dados Pessoais:

Nome: _____

E-mail: _____

1. Faixa etária:

- 15-25
 26-35
 36-50
 acima de 50 anos

2. Ocupação:

- aluno: graduação pós-graduação
 funcionário
 professor
 outro _____

3. Gosta/consome queijo maturado? () Sim () Não

4. Frequência de consumo de queijos:

- Frequentemente - _____ vezes por semana
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Nunca

5. Frequência de consumo de produtos contendo probióticos:

- Frequentemente - _____ vezes por semana
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Nunca

6. Produtos que costuma consumir (4 e 5):

7. Já consumiu cúrcuma em algum produto/alimento? () Sim () Não

8. Se sim, em qual?

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na forma de convite para produto funcional na análise de aceitação.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:

“Queijo Minas Curado Funcional Adicionado de Cúrcuma”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar da pesquisa “Queijo Minas Curado Funcional Adicionado de Cúrcuma”, realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Londrina-PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um queijo Minas Curado, adicionado de cultura probiótica (*Enterococcus faecium*), cultura proteolítica (*Lactobacillus helveticus*) e de cúrcuma em pó comercial. A sua participação é muito importante e irá requerer cerca de quinze minutos. Você participará como provador e irá consumir o produto, sendo solicitado a dar sua opinião se gostou ou não do produto. Será realizada uma sessão e você poderá participar no horário em que tiver maior disponibilidade. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Entre os benefícios esperados, está incluída a diminuição do tempo de trânsito intestinal, atividade antioxidante. A sua ingestão não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após o consumo do produto. Informamos que não haverá pagamento, nem remuneração por sua participação. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof^ª. Dr^ª. Sandra Garcia ou Katri Gasparin, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UEL) no telefone (43) 3371-5966, no e-mail sgarcia@uel.br / katri.gasparin@hotmail.com ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de

Londrina, na Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445) Campus Universitário – ao lado do banco Itaú – Londrina PR, CEP: 86057-970, ou no telefone (43) 3371-5455. Este termo deverá ser preenchido e assinado em duas vias de igual teor, sendo uma delas entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2015.

Pesquisador Responsável

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Mestranda

Katri Gasparin

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

ANEXO D - Modelo de ficha para o teste de aceitação dos atributos sensoriais estruturados em escala hedônica de 9 pontos.

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de queijo Minas Curado funcional adicionado ou não de cúrcuma. Por favor, avalie a amostra, da esquerda para direita, com relação aos atributos sabor, textura, aroma, aparência e aceitação global, utilizando a escala abaixo para dizer o quanto gostou ou desgostou do produto e, se desejado, faça comentários sobre ele.

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

AMOSTRAS	APARÊNCIA	AROMA	SABOR	TEXTURA	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentários: _____

ANEXO E – Página de acesso do *Curriculum lattes* dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Endereço de acesso: <<http://lattes.cnpq.br/6040080684084312>>

Orientada em nível de Mestrado: Katri Gasparin

Endereço de acesso: <<http://lattes.cnpq.br/8747193982689001>>