INSTITUTO FEDERAL
Sudeste de Minas Gerais | Campus Rio Pomba

Contribuições para a área de alimentos:

experiências do

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos campus Rio Pomba

1ª edição - Volume 2

Organizadores:

Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto
Maurilio Lopes Martins
Augusto Aloísio Benevenuto Junior
Eliane Maurício Furtado Martins
José Manoel Martins
Maurício Henriques Louzada Silva
Vanessa Riani Olmi Silva
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

Departamento Acadêmico
DCTA
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Contribuições para a Área de Alimentos: Experiências do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campus Rio Pomba

Organizadores:
Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto
Maurilio Lopes Martins
Augusto Aloísio Benevenuto Júnior
Eliane Maurício Furtado Martins
José Manoel Martins
Maurício Henriques Louzada Silva
Vanessa Riani Olmi Silva
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

1ª edição
Volume - 2
IF Sudeste MG
Rio Pomba/MG
2020

Direitos de Publicação Reservados ao IF Sudeste MG
Impresso no Brasil – ISBN: 978-65-87185-11-8
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba
Reitor: Charles Okama de Souza
Diretor Geral do Campus Rio Pomba: João Batista Lúcio Correa
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação: Rafael Monteiro Araújo Teixeira
Coordenador do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Maurilio Lopes Martins
Capa: Welliton Fagner da Cruz
Formatação: Aline Oliveira Barra Moreira
Revisores: Cleiton de Souza Batista
Cleuber Raimundo da Silva
Débora Rezende Ferreira
Elisângela Michelle Miguel
Fabíola Cristina de Oliveira
Isabela Campelo de Queiroz
Kamila Ferreira Chaves
Patrícia Rodrigues Condé
Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos
Roselir Ribeiro da Silva
Sabrina Késsia Gonçalves Pereira

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba

Bibliotecária: Julia Aparecida Gonçalves Campos - CRB 6/2640

C764
v. 2
Contribuições para a área de alimentos: experiências do mestrado profissional em ciência e tecnologia de alimentos, campus Rio Pomba. / Organizadores Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto (*et al.*) – Rio Pomba, IF Sudeste MG, 2020.
238p. : il.
E-book.
ISBN: 978-65-87185-11-8.

1. Pesquisa - Inovação 2. Desenvolvimento de produtos. 3. Processamento de alimentos. I. Benevenuto, Wellingta Cristina Almeida do Nascimento. II. Martins, Maurilio Lopes. III. Benevenuto Júnior, Augusto Aloísio. IV. Martins, Eliane Maurício Furtado. V. Martins, José Manoel. VI. Silva, Maurício Henriques Louzada. VII. Silva, Vanessa Riani Olmi. VIII. Martins, Aurélia Dornelas de Oliveira. IX. Título.

CDD:664

SUMÁRIO

PREFÁCIO……..……. 1

AUTORES…… 2

CAPÍTULO 1- UTILIZAÇÃO DE CHIA (*SALVIA HISPANICA* L.*)* COMO ALTERNATIVA PARA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA GORDURA EM PRODUTOS CÁRNEOS BOVINOS REESTRUTURADOS……. 6

CAPÍTULO 2- METABÓLITOS FÚNGICOS PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS: DESAFIO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE..... 21

CAPÍTULO 3- PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL CONTENDO BACTÉRIAS PROBIÓTICAS COM ÊNFASE EM VEGETAIS FERMENTADOS……. 37

CAPÍTULO 4- QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO: MATURAÇÃO E SEGURANÇA ALIMENTAR……... 72

CAPÍTULO 5- PERSPECTIVAS DO DESENVOLVIMENTO DE HAMBÚRGUERES MAIS SAUDÁVEIS REDUZINDO SÓDIO E ADICIONANDO AROMATIZANTES E LINHAÇA……. 106

CAPÍTULO 6- REDUÇÃO DE SAL EM PRODUTOS ELABORADOS COM CARNE PSE: MAIS UM DESAFIO PARA A INDÚSTRIA BRASILEIRA..... 122

CAPÍTULO 7- COLONIZAÇÃO INTESTINAL E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO KEFIR ADICIONADO DE MEL……... 139

CAPÍTULO 8- EFEITO ANTIMICROBIANO DO KEFIR…….. 161

CAPÍTULO 9 - POTENCIAL PROTEOLÍTICO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO DETERIORANTE NAS CASEÍNAS…… 177

CAPÍTULO 10- IMPORTÂNCIA DO FERMENTO ENDÓGENO E DAS CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO PARA O QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO……... 194

CAPÍTULO 11- LARVA DE TENEBRIO MOLITOR COMO FONTE DE PROTEÍNA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA: POSSIBILIDADES E PERSPECTIVAS…….. 222

PREFÁCIO

É com imensa alegria que a equipe do curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos publica esta obra, cujo objetivo é divulgar as pesquisas realizadas pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, campus Rio Pomba.

Este livro foi escrito por professores e mestres profissionais e apresenta temas relevantes relacionados à Ciência e Tecnologia de Alimentos. É direcionado a profissionais da área, estudantes de graduação e pós-graduação, pesquisadores e professores.

Nessa segunda edição, intitulada "Contribuições para a Área de Alimentos: Experiências do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campus Rio Pomba", estão presentes onze capítulos oriundos das revisões de literatura das dissertações defendidas em 2018 no Programa. Temas das linhas de pesquisa: Processamento de Alimentos e Desenvolvimento de Produtos e Segurança Alimentar e Gerenciamento Ambiental pertencentes ao Programa são abordados. Esses temas incluem assuntos como produtos cárneos, aplicação de metabólitos de fungos para conservação de alimentos, bactérias probióticas, vegetais fermentados, queijo Minas artesanal, kefir, bactérias psicrotróficas proteolíticas e fontes alternativas de proteína para alimentação humana.

Agradecemos a todos da equipe envolvida na organização do segundo volume deste livro, além dos professores do Programa, à Diretoria de Pesquisa e Pós-graduação pela concessão de bolsas a discentes e docentes, e à Pró-reitoria de Pesquisa e Inovação pelo apoio por meio de editais com bolsa para pesquisadores e discentes, além de recurso financeiro para aquisição de material de consumo para as pesquisas.

Esperamos que esta obra, que consiste no segundo volume, possa lhes ser útil e venha contribuir com informações relevantes para a sua carreira profissional.

Coordenação do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Prof. Maurilio Lopes Martins e Profa. Eliane Maurício Furtado Martins

AUTORES

André Narvaes da Rocha Campos
Professor do Departamento de Agricultura e Ambiente do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: andre.campos@ifsudestemg.edu.br

Augusto Aloísio Benevenuto Júnior
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: augusto.junior@ifsudestemg.edu.br

Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: aurelia.dornelas@ifsudestemg.edu.br

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
Pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig Sudeste, Viçosa.
E-mail: claudia.epamig@gmail.com

Cleuber Antônio de Sá Silva
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: cleuber.silva@ifsudestemg.edu.br

Cristina Henriques Nogueira
Docente do Departamento de Matemática, Física e Estatística do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: cristina.nogueira@ifsudestemg.edu.br

Eduardo Mendes Ramos
Docente Associado IV do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).
E-mail: emramos@ufla.br

Eliane Maurício Furtado Martins
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
e-mail: eliane.martins@ifsudestemg.edu.br

Frederico Souzalima Caldoncelli Franco
Docente do Núcleo de Educação Física do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail:frederico.franco@ifsudestemg.edu.br

Jéssica Beatriz da Silva Reis
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: jessicareis1994@gmail.com

José Manoel Martins
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: jose.manoel@ifsudestemg.edu.br

Larissa Mattos Trevizano
Docente do Departamento de Educação do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: larissa.trevizano@ifsudestemg.edu.br

Letícia Costa Amorim da Trindade
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: leticiacosta-12@hotmail.com

Marcela da Silva Gonçalves
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: marcelasilvagoncalves@yahoo.com.br

Maria Aparecida Senra Rezende
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: cidasenrez@hotmail.com

Maria Paula Jensen Rodrigues
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: mariapaula.jensen@hotmail.com

Mariana Pacheco Neves
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: mariana.pneves@hotmail.com

Marielle Maria de Oliveira Paula
Mestre em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) e doutoranda em Ciência dos Alimentos na UFLA.
E-mail: marielle.paula@estudante.ufla.br

Maurício Henriques Louzada
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.

E-mail: mauricio.louzada@ifsudestemg.edu.br

Maurilio Lopes Martins
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

Patrícia Rodrigues Condé
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: patricia.conde@ifsudestemg.edu.br

Priscilla Araújo Campos
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: priscillaacampos@yahoo.com.br

Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: Renata.campos@ifsudestemg.edu.br

Rosana Campos do Vale
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: rosanacampos17@yahoo.com.br

Roselir Ribeiro da Silva
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: roselir.silva@ifsudestemg.edu.br

Sâmya Petrina Pessoa Oliveira
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: samyapetrina@hotmail.com

Scarlet Ohana da Silva Gandra
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: scarlet05jbgandra@gmail.com

Sebastião Moreira Júnior
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: sebastiao_laticinios@hotmail.com

Thatiana Lopes de Oliveira
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: thatati.lopes@yahoo.com.br

Vanessa Riani Olmi Silva
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: vanessa.riani@ifsudestemg.edu.br

Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto
Docente do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: wellingta.benevenuto@ifsudestemg.edu.br

Welliton Fagner da Cruz
Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.
E-mail: wellitondacruz@yahoo.com.br

Wharley Camargo Dias
Graduando em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG campus Rio Pomba.
E-mail: w_camargo22@hotmail.com

CAPÍTULO 1 - UTILIZAÇÃO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) COMO ALTERNATIVA PARA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA GORDURA EM PRODUTOS CÁRNEOS BOVINOS REESTRUTURADOS

Marcela da Silva Gonçalves
Marielle Maria de Oliveira Paula
Augusto Aloísio Benevenuto Júnior
Eduardo Mendes Ramos
Maurício Henriques Louzada Silva
Vanessa Riani Olmi Silva

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, é visível a busca dos consumidores por alimentos cada vez mais saudáveis, de fácil preparo e sabor agradável. A preocupação com a saúde tem levado os consumidores à escolha de alimentos com baixo teor de gordura e com melhor perfil nutricional.

Produtos cárneos reestruturados, além de suas características sensoriais atrativas aos consumidores, são de fácil preparo, por isso estão inseridos nos hábitos alimentares da população brasileira. Estes apresentam proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais em sua composição, porém, têm sido também associados como prejudiciais à saúde, devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados e colesterol. Assim, há uma procura por melhorias nutricionais nestes produtos, como um teor de gordura reduzido ou substituído para um melhor perfil lipídico.

No entanto, reduzir ou substituir a gordura animal não é uma tarefa fácil para a indústria cárnea, visto que, este componente exerce importantes funções na formulação dos produtos. Logo, quando removida, na maioria dos casos, a estabilidade física, propriedades funcionais e sensoriais podem ser afetadas, influenciando na perda de peso, capacidade de retenção de água, textura e sabor. Desta forma, uma alternativa à substituição da gordura em produtos cárneos reestruturados é a adição de fibras.

Dentre as fontes de fibras que podem ser utilizadas, a semente de chia (*Salvia hispanica L.*) tem ganhado atenção como um componente alimentar, pois é fonte de ácidos graxos ômega-3, proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e antioxidantes.

A semente de chia possui excelente capacidade de retenção de água, o que leva à formação de gel, aumentando o volume e consequentemente o rendimento do processo. Além disso, ao provocar movimentos peristálticos no intestino, a mesma, facilita o trânsito

intestinal, evitando distúrbios e constipações, sendo considerada também um alimento funcional.

Deste modo, a elaboração de produtos cárneos reestruturados adicionados de semente de chia (*Salvia hispanica L.*) em substituição parcial da gordura pode ser uma alternativa viável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos cárneos reestruturados

A carne é reconhecida como um importante alimento para os seres humanos, sendo fonte de proteínas e aminoácidos de alto valor biológico, além de minerais e vitaminas (OLMEDILLA-ALONSO; JIMENEZ-COLMENERO; SANCHEZ-MUNIZ, 2013; RAMOS; GOMIDE, 2017).

O relatório anual de 2019 da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2020) afirma que, em 2018, o Brasil foi o maior produtor e exportador de carne bovina do mundo e que a bovinocultura de corte representou 8,7% do PIB total brasileiro. O País possui 214,68 milhões de cabeças de gado, sendo que a maior parte do rebanho está localizada na região centro-oeste. Em 2018, mais de 44,23 milhões de animais foram abatidos e 20,1% da carne produzida foi destinada à exportação.

Para a área de processamento, os custos de produção estimulam o estudo e o desenvolvimento de novas tecnologias, visando a utilização de todas as partes do animal com objetivo de minimizar as perdas e maximizar o lucro das empresas. Tal fator inclui a implementação de métodos de reestruturação de carnes como aparas e cortes de baixo valor comercial para melhorar a aparência e textura do novo produto, além de um aproveitamento total da carcaça (FERREIRA et al., 2012).

Neste âmbito, os produtos reestruturados, como empanados, salsichas, hambúrgueres, almôndegas, nuggets e quibe vêm ganhando mercado e se destacando como os principais responsáveis pelo crescimento do segmento cárneo congelado (ROCHA, 2015). Como principais razões para este alto consumo, podem-se citar as características sensoriais agradáveis, praticidade de consumo e alto teor proteico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Desta forma, através de processos de reestruturação de carnes é possível elaborar produtos de boa qualidade a partir de porções de carne com textura deficiente, de difícil comercialização e de baixo valor comercial, oferecendo um produto com maior qualidade e preços baixos (NASSARL et al., 2012).

No entanto, os produtos cárneos processados têm sido associados negativamente com saudabilidade. Por apresentarem altos níveis de gordura em sua composição, podem ser um fator prejudicial à saúde, como a incidência de doenças crônicas (MICHA; WALLACE; MOZAFFARIAN, 2010; DING et al., 2018).

Polkinghorne e Thompson (2010) descrevem que os consumidores buscam por produtos cárneos mais saudáveis, com teores reduzidos de sal, gordura, ou ainda, produtos que contenham ingredientes capazes de promover melhorias à saúde, como os carotenoides e as fibras. Porém, os consumidores também esperam que os produtos com formulações modificadas possuam mesmo sabor, aparência e aroma quando comparados aos produtos formulados e processados tradicionalmente.

A reestruturação permite oferecer produtos com qualquer forma ou tamanho, podendo assim diversificar a oferta, e, sobretudo, a possibilidade de incorporação de outros alimentos ou compostos que os tornam mais saudáveis, nutritivos e atrativos (MENDES, 2011).

Dentre os produtos reestruturados bovinos, podemos destacar o hambúrguer, o quibe e a almôndega, produtos com definições e padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2000): entende-se por hambúrguer o produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado, que se conserva pela aplicação do processo de congelamento, já que os aditivos adicionados visam apenas atuarem no rendimento e prevenção da oxidação; quibe (kibe) é o produto cárneo industrializado, obtido de carne bovina ou ovina, moída, adicionado com trigo integral, acrescido de ingredientes, tratando-se de um produto cru, frito ou assado; a almôndega é um produto obtido a partir da carne moída de uma ou mais espécies de animais de açougue, moldada na forma arredondada, adicionada de ingredientes e submetido ao processo tecnológico adequado. Trata-se de um produto cru, semifrito, frito, cozido ou esterilizado.

2.2. Substituição de gordura em produtos cárneos

Mudanças sociais, econômicas e culturais que vêm ocorrendo nas últimas décadas, impulsionaram as alterações nos hábitos e comportamentos alimentares. Como exemplo, têm-se o incremento da participação do consumo alimentar fora de casa, o aumento do consumo de alimentos processados (MONTEIRO et al., 2011; OLIVEIRA; SILVA; CORREIA, 2013) e a substituição das refeições e preparações tradicionais por lanches com elevada concentração de energia, gorduras, açúcar e sódio (DISHCHEKENIAN et al., 2011). Tais características, associam-se a condições relacionadas com a nutrição e o metabolismo, como a obesidade, as doenças cardiovasculares, a hipertensão, o diabetes e o câncer (MALIK et al., 2010; DING et al., 2018), as quais são as principais responsáveis pelos óbitos no Brasil (SCHMIDT, 2011).

Desta forma, a busca por uma alimentação saudável faz com que os consumidores procurem por produtos que aliem saúde ao prazer de um alimento palatável. Este perfil de consumidores impulsiona o desenvolvimento de produtos com redução de gordura, sem causar prejuízos ao seu sabor e qualidade (FORKER et al., 2012; DING et al., 2018).

O desenvolvimento de produtos cárneos mais nutritivos e menos gordurosos se fez necessário para satisfazer a necessidade dos consumidores (HAN; BERTRAM, 2017). Embora a gordura seja uma fonte importante de energia e ácidos graxos essenciais, bem como transportadora de vitaminas lipossolúveis em produtos à base de carne (HENNING; TSHALIBE; HOFFMAN, 2016), nos últimos anos, as demandas dos consumidores por carne e produtos de carne mais seguros e de maior qualidade, com níveis reduzidos de gordura e uma composição melhorada do perfil de ácidos graxos, têm aumentado a tendência à incorporação de ingredientes que melhoram a saúde (HOCQUETTE et al., 2012).

Há alguns estudos que investigam o impacto das informações relacionadas à saúde sobre a preferência por produtos à base de carne. Esses estudos se concentraram em: 1) informações sobre os benefícios nutricionais inerentes da carne (ou seja, fonte de ferro, rica em proteína, etc.) (GRUNERT et al., 2011; VAN WEZEMAEL et al., 2014); 2) reivindicações de redução de sal e/ou gordura na carne processada (SHAN et al., 2017); e 3) reivindicações sobre ingredientes saudáveis adicionados durante o processamento (GRASSO et al., 2016; SHAN et al., 2017). Todos estes autores sugeriram que, as alegações de saúde sobre a carne são positivamente percebidas, no entanto, as

avaliações dos consumidores de diferentes tipos de alegações nutricionais e de saúde, variam em todos os países e dependem de ter ou não algum conhecimento prévio sobre ingredientes saudáveis adicionados.

Assim, a crescente preocupação e relação entre a saúde, alimentação e manutenção do peso saudável, tem impulsionado o mercado de alimentos a produzir produtos com reduzido valor energético (BOFF et al., 2013). Como a gordura tem maior densidade calórica do que a maioria dos nutrientes nos alimentos, a sua redução é atualmente uma das principais tendências em inovação de produto alimentar (MA; BOYE, 2013). Cabe também ressaltar que, no Brasil, um produto é considerado com teor reduzido quando houver uma diminuição de, no mínimo, 25% no valor de determinado nutriente quando comparado com um alimento de referência (BRASIL, 2012).

Desta maneira, os alimentos de preparo rápido e de grande abrangência popular, como produtos cárneos reestruturados, vêm se tornando interessantes objetos de estudo nesta área (VERMA; SHARMA; BANERJEE, 2010). Sendo um dos grandes desafios identificar estratégias comercialmente viáveis que são capazes de remover ou reduzir o teor de gordura de produtos alimentares, sem alterar as suas características sensoriais e nutricionais (BOFF et al., 2013; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ, 2020).

Uma das alternativas aplicadas para reduzir o teor de gordura nos produtos cárneos baseia-se na substituição da gordura por ingredientes não cárneos, tais como proteínas animais ou vegetais e fibras dietéticas, seja para atingir as características texturizadas desejadas e certas características funcionais ou para influenciar a composição do produto final (SCHUH; WEISS, 2015; DING et al., 2018).

2.3. Utilização de fibras alimentares

Substituir ingredientes menos nutritivos por outros de maior valor nutricional, sem comprometer o sabor dos alimentos é um desafio para a indústria, porém, é uma prática de relevância para se constituir uma dieta saudável (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LÓPEZ; TECANTE, 2010). A relação entre dieta e saúde sempre foi um tópico de interesse entre os profissionais da área de alimentos. Por consequência, uma crescente atenção é dada ao oferecimento de novos produtos que possam vir a provocar mudanças benéficas nos hábitos alimentares dos consumidores (WEISS et al., 2010).

As modificações em produtos cárneos que podem levá-los à funcionalidade e que têm sido assunto de diversos estudos são: modificações dos níveis de ácidos graxos e colesterol da carne, adição de óleos vegetais, adição de soja, adição de extratos naturais com propriedades antioxidantes, controle de cloreto de sódio, adição de óleos de pescado, adição de produtos vegetais e adição de fibras vegetais (RODRÍGUEZ-CARPENA; MORCUENDE; ESTÉVEZ, 2011; PAULA et al., 2019).

Dentro deste cenário, diferentes substitutos de gordura existentes no mercado, como as fibras alimentares, têm sido objeto de estudo de uma diversidade de pesquisas na área de alimentos, incluindo a produção de produtos cárneos (DECKER; PARK, 2010; ZHANG et al., 2010; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ, 2020).

As fibras auxiliam no aumento de rendimento, na redução de custo da formulação, na melhoria da textura e traz benefícios para a saúde do consumidor (TALUKDER, 2015), por isso têm ocupado lugar de destaque devido aos resultados que revelam a ação benéfica desses nutrientes no organismo e a relação entre o seu consumo em quantidades adequadas e a prevenção de doenças (BRUMMER; KAVIANI; TOSH, 2015).

De acordo com a comissão do *Codex Alimentarius*, fibras alimentares, são polímeros de carboidratos não digeridos, tampouco absorvidos no intestino delgado. Podem ser classificadas nas seguintes categorias: polímeros de carboidratos comestíveis, inerentes aos alimentos que são consumidos; polímeros de carboidratos obtidos a partir de matéria-prima alimentar por meio de procedimentos enzimáticos, físicos ou químicos, os quais tenham mostrado efeito fisiológico benéfico à saúde, através de meios científicos aceitos pelas autoridades competentes; ou polímeros de carboidratos sintéticos que apresentam efeito fisiológico benéfico à saúde, através de meios científicos aceitos pelas autoridades competentes (MENEZES et al., 2013).

Os constituintes da fibra alimentar são, na sua maior parte, substâncias de origem vegetal, oriundas da parede celular e, em menor parte, de alguns polissacarídeos provenientes de outras partes das plantas ou sintetizados por microrganismos. A fibra alimentar está presente na dieta humana por meio do consumo de alimentos de origem vegetal, nos quais se encontra normalmente como constituinte natural, em alimentos onde tenha sido adicionada e na forma de suplementos alimentares ricos em fibra (MENDES, 2011).

Entre os principais benefícios obtidos pela ingestão de fibra na alimentação estão: a redução de colesterol sanguíneo, melhorias na função do intestino grosso, diminuição da glicemia pós-prandial (colaborando desta forma para a prevenção ou redução de doenças intestinais), diminuição do risco de doença cardíaca coronária e diabetes do tipo 2. As fibras colaboram para as propriedades reológicas de produtos por meio de características como a solubilidade, viscosidade, formação de gel, capacidade de retenção de água e aumento de volume pela associação entre moléculas (MUDGIL; BARAK, 2013).

As fibras alimentares totais são classificadas de acordo com a sua estrutura, a sua solubilidade em água e em relação ao seu grau de utilização (fermentação bacteriana) no organismo humano (MENDES, 2011). Os carboidratos não digeríveis podem ser classificados como solúveis e insolúveis, sendo que fibras solúveis formam uma solução quando misturadas com água e o mesmo não ocorre com os componentes insolúveis. A condição fisiológica e efeitos físico-químicos das fibras dietéticas dependem da quantidade de fibra, especialmente, no que se refere às frações solúveis e insolúveis (ELLEUCH et al., 2011).

De acordo com a Resolução nº 54 (BRASIL, 2012), define-se produto rico em fibras quando o teor mínimo de fibra alimentar for de 6 g em 100 g de produto sólido (3 g/100 mL para produtos líquidos), enquanto que produto fonte de fibra deve apresentar teor mínimo de 3 g/100 g (1,5 g/100 mL para líquidos). A *American Dietetic Association* (ADA, 2008) sugere o consumo diário de 14g de fibras por 1000 Kcal, ou 38 g para homens adultos e 25 g para mulheres. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) recomenda um consumo superior a 25 g/dia de fibra total para adultos.

A sua aplicação como ingrediente alimentar é amplamente considerada com duplo propósito: aumentar o teor de fibra em alimentos para gerar benefícios à saúde e melhorar as propriedades funcionais ou tecnológicas de produtos (EL KHOURY et al., 2012). Outra característica benéfica de fibras altamente viscosas, como β-glicanas, hidrocoloides e pectinas é a influência nos níveis lipídicos do sangue (MUDGIL; BARAK, 2013).

Diante do exposto, o aumento do consumo de produtos cárneos, aliado à necessidade de produzir alimentos saudáveis com boa aceitabilidade, incrementou os estudos sobre o uso de fibras nestes produtos. Assim, a incorporação de componentes

funcionais em derivados cárneos oferece benefícios adicionais à saúde e, além da função básica de nutrir, os torna reconhecidos como alimentos funcionais (HAO; BETA, 2012). Produtos enriquecidos com fibras são considerados mais saudáveis quando comparados com os convencionais, mas pode alterar as características sensoriais (DECKER; PARK, 2010; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ, 2020).

Vários tipos de fibras têm sido avaliados isoladamente ou combinados com outros ingredientes em formulações de produtos com teor de gordura reduzido, como em carnes moídas, produtos reestruturados (SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2010; PAULA et al., 2019) e emulsionados (CHOI et al., 2010). O desenvolvimento de produtos cárneos com a adição de fibras alimentares, preservando as propriedades sensoriais características, como a cor e a textura, pode ser um estímulo ao incremento de itens saudáveis na dieta dos consumidores. Entre os alimentos funcionais, chia, linhaça e perilla são reconhecidos como importantes fontes de ácidos graxos essenciais, ômega-3 (w-3), que são importantes para a saúde humana (ASIF, 2011; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ, 2020). No entanto, não há consenso quanto à quantidade máxima de incorporação de fibra em diferentes produtos cárneos, porém, o excesso de fibra pode trazer alterações indesejáveis nas características sensoriais do produto, como alterações na cor e textura. As alterações provocadas nos produtos podem estar relacionadas com as diferenças das características físicas, químicas e tecnológicas das fibras (MUDGIL; BARAK, 2013).

Em destaque, a chia é particularmente interessante dentro dessa lógica, que, além de melhorar o valor nutritivo, apresenta grande capacidade para reter água e óleo, características que fazem dela uma alternativa como ingrediente para indústria de alimentos (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LÓPEZ; TECANTE, 2010; FERNANDES; SALAS-MELLADO, 2017).

2.4. Semente de chia (*Salvia hispanica L.*)

A *Salvia hispanica L.*, comumente conhecida como chia, oferece um considerável potencial para o desenvolvimento de alimentos saudáveis. Sua cultura foi expandida até a América do Sul, sendo comprovadamente consumida há séculos pelas civilizações Maias e Astecas. Mas apenas há pouco tempo ressurgiu o interesse por esta semente, por ser considerada um alimento com significativo valor nutricional (JIN et al., 2012).

Fonte de ácidos graxos ômega-3 (principalmente ácido α-linolênico), suas sementes possuem quantidade significativa de lipídios (cerca de 40% do peso total da semente, sendo quase 60% como ômega-3), fibra alimentar (mais de 30% do peso total) e proteínas de elevado valor biológico (cerca de 19% do peso total). Dentre o conteúdo proteico, destacam-se as altas concentrações de ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico, porém a semente é pobre em lisina, não devendo ser, portanto, uma fonte única de proteínas (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LÓPEZ; TECANTE, 2010; PAULA et al., 2019). Além disso, contém minerais, vitaminas e antioxidantes naturais como tocoferóis e polifenóis, sendo os principais compostos fenólicos o ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e kaempferol, que possuem alegação de saúde (IXTAINA et al., 2011, MUÑOZ et al., 2013).

Por apresentar boas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), particularmente ácido α-linolênico, que promovem uma redução na incidência de doenças cardiovasculares (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014), o consumo de chia auxilia nas funções imunológicas, inibindo a proliferação de linfócitos e citocinas pró inflamatórias e mantém a integridade das membranas celulares e dos neurotransmissores (YAO et al., 2012; DING et al., 2018).

Como as autoridades de saúde e alimentação recomendam diminuir a ingestão de gordura saturada e aumentar a ingestão de fibras, proteínas e ácidos graxos ômega-3, a chia é uma alternativa promissora para o aumento desses componentes na dieta, já que é rica em PUFA's, proteínas, fibras e compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante (COELHO; SALAS-MELLADO, 2015; FERNANDES;SALAS-MELLADO, 2017).

Quando uma porção desta fibra é adicionada em um copo d'água ela se gelifica, fator decorrente da presença de hidrocarbonetos com grupos polares livres, e, quando consumida, auxilia no aumento no volume das fezes, o que provoca movimentos peristálticos do intestino com mais frequência. Isto por sua vez facilita o trânsito do bolo fecal ajudando a reduzir a probabilidade de distúrbios do trato intestinal e prisão de ventre (VÁZQUEZ et al., 2009).

Desta maneira, adicionar chia a um produto alimentar não só melhora as propriedades nutritivas e saudáveis de um produto e de seus componentes, como também pode conferir propriedades tecnológicas como alta capacidade de retenção de

água, atividade emulsionante ou capacidade de gelificação (COOREY; TJOE; JAYASENA, 2014; PAULA et al., 2019).

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o atual estilo de vida adotado pelas pessoas nas últimas décadas e considerando as rotinas com menor tempo, tem aumentado consideravelmente o consumo de alimentos práticos e processados. Dentre os produtos cárneos, destacam-se hambúrguer, almôndega e quibe, como sendo opções práticas e saborosas. No entanto, devido ao alto teor de gordura utilizado na fabricação destes produtos, que auxiliam não somente no sabor, mas também na suculência e maciez do produto final, têm-se a necessidade de encontrar um ingrediente que mantenha essas qualidades e que seja capaz de reduzir o teor de gordura final do produto, tornando-o mais saudável, como a utilização de fibras.

Desta forma, a utilização da semente de chia pode ser uma alternativa satisfatória para alcançar a redução de gordura nas formulações de produtos cárneos reestruturados de carne bovina.

4. REFERÊNCIAS

ABIEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Perfil da Pecuária no Brasil.** 2019. 49 p. Disponível em: http://www.abiec.com.br/PublicacoesLista.aspx. Acesso em: 21 jan. 2020.

ADA. AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Nutrition and Lifestyle for Healthy Pregnancy Outcome. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 3, p. 553- 561, 2008.

ASIF, M. Health effects of omega-3, 6, 9 fatty acids*: Perilla frutescens*is a good example of plant oils. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 11, p. 51-59, 2011.

BOFF, C. C. *et al*. Desenvolvimento de sorvete de chocolate utilizando fibra de casca de laranja como substituto de gordura. **Ciência Rural***,* v. 43, p. 1892-1897, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 agosto de 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 novembro 2012.

BRUMMER, Y.; KAVIANI, M.; TOSH, S. M. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. **Food Research International,** v. 67, p. 117-125, 2015.

CHOI, Y. S. *et al*. Effects of replacing pork back fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters. **Meat Science**, v. 84, n. 3, p. 557-563, 2010.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Chemical Characterization of Chia (*Salvia hispanica*L.) for Use in Food Products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 5, p. 263-269, 2014.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 729-, 2015.

COOREY, R.; TJOE, A.; JAYASENA, V. Gelling properties of chia seed and flour. **Journalof Food Science**, v. 79, p. 859-866, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 720 p.

DECKER, E.A.; PARK, Y. Healthier meat products as functional foods. **Meat Science**, v. 86, p. 49-55, 2010.

DING, Y.; LIN, H. W.; LIN, Y. L.; YANG, D. J.; YU, Y. S.; CHEN, J. W.;CHEN, Y. C. Nutritional composition in the chia seed and its processing properties on restructured ham-like products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v 26, p.124-34, 2018.

DISHCHEKENIAN, V. R. M.; ESCRIVÃO, M. A. M. S; PALMA, D.; ANCONA-LOPES, F.; ARAÚJO, E. A. C; TADDEI, J. A. A. C. Padrões alimentares de adolescentes obesos e diferentes repercussões metabólicas. **Revista Nutrição** v. 24, p. 17-29, 2011.

EL KHOURY, D. *et al*. Beta Glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.1, p.1-29, 2012.

ELLEUCH, M. *et al*. Dietary fibre and fibre-rich by products of food processing: Characterization, techtechnological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**, v. 124, p. 411-421, 2011.

FERNANDES, S. S.; SALAS-MELLADO, MDLM. Addition of chia seed mucilage for reduction of fat content in bread and cakes. **Food Chemistry,** v. 227, p. 237-244, 2017.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. *et al*. Quinoa and chia products as ingredients for healthier processed meat products: Technological strategies for their application and effects on the final product. **Current Opinion in Food Science**, 2020.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; MEDEIROS, R. J.; POMBO, C. R.; FREITAS, M. Q.; SÃO CLEMENTE, S. C.; CONTE-JUNIOR, C. A. Comparação das características físico-químicas e sensoriais de hambúrgueres de carne bovina elaborados com cloreto de sódio, polifosfato e transglutaminase. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 52-60, 2012.

FORKER, A. *et al*. A combination of fat replacers enables the production of fat-reduced shortdough biscuits with high-sensory quality. **Food AndBioprocess Technology**, v.5, n.6, p.2497-2505, 2012.

GRASSO, S.; BRUNTON, N. P.; LYNG, J. G.; HARRISON, S. M.; MONAHAN, F. J. Quality of deli-style turkey enriched with plant sterols. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 743-751, 2016.

GRUNERT, K. G.; VERBEKE, W.; KUGLER, J. O.; SAEED, F.; SCHOLDERER, J. Use of consumer imsight in the new product development process in the meat sector. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 251-258, 2011.

HAN, M.; BERTRAM, H. C. Designing healthier comminuted meat products: Effect of dietary fibers on wate distribution and texture of a fat-reduced meat model system. **Meat Science**, v. 133, p. 159-165, 2017.

HAO, M.; BETA, T. Development of Chinese steamed bread enriched in bioactive compounds from barley hull and flaxseed hull extracts. **Food Chemirtry**, v. 133, p.1320-1325, 2012.

HENNING, S. S. C.; TSHALIBE, P.; HOFFMAN, L. C. Physico-chemical properties of reduced-fat beef species sausage with pork back fat replaced by pineapple dietary fibres and water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 92–98, 2016.

HOCQUETTE, J. F. *et al*. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, v. 92, p. 197-209, 2012.

IXTAINA, V. Y.; MARTÍNEZ, M. L.; SPOTORNO, V.; MATEO, C. M.; MAESTRI, D. M.; DIEHL, B. W. K. Characterization of Chia Seed Oils Obtained by Pressing and Solvent Extraction. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011.

JIN, F.; NIEMAN, D.C.; SHA, W.; XIE, G.; QIU, Y.; JIA, W. Supplementation of Milled Chia Seeds Increases Plasma ALA and EPA in Postmenopausal Women. **Plants Foods for Human Nutrition, Kannapolis**, v. 67, n. 2, p. 105–110, 2012.

MA, Z.; BOYE, J. Advances in the design and production of reduced-fat and reduced-cholesterol salad dressing and mayonnaise: a review. **Food and Bioprocess Technology***,* v. 6, p. 648-670, 2013.

MALIK, V. S.; POPPKIN, B. M.; BRAY, G. A.; DESPRES, J. P.; WILLETT, W. C., HU, F. B. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care***,* v. 33, p. 2477-83, 2010.

MENDES, T. F. **Optimização de Produtos Reestruturados de Carne de Perna de Borrego**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MENEZES, E.W. *et al*. Codex dietary fibre definition – Justification for inclusion of carbohydrates from 3 to 9 degrees of polymerization. **Food Chemistry**, v. 140, p. 581-585, 2013.

MICHA, R.; WALLACE, S. K.; MOZAFFARIAN, D. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Circulation**, v. 121, n. 21, p. 2271–2283, 2010.

MONTEIRO, C. A.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; CASTRO, I. R.; CANNON, G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutr***.* v. 14, p. 5-13, 2011.

MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p.1-6, 2013.

MUÑOZ, L. A.; COBOS, A.; DIAZ, O.; AGUILERA, J. M. Chia seed (*Salvia hispanica*): An ancient grain and a new functional food. **Food Reviews International**. v. 29, p. 394–408, 2013.

NASSARL, M. P. M.; ALMEIDA, V. C. N.; RODRIGUES, V. P.; LEONARDO, L.; OLIVEIRA, J. D.; SILVA, T. R. S.; CORREIA, M. G. S. Fatores determinantes da qualidade nutricional da carne bovina. Cadernos de Graduação - **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.1, n.16, p.37-46, 2013.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, T. R. S.; CORREIA, M. G. S. Fatores determinantes da qualidade nutricional da carne bovina. Cadernos de Graduação. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v.1, n.16, p.37-46, 2013.

OLIVOS-LUGO, B. L.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. Á.; TECANTE, A. Thermal and Physicochemical Properties and Nutritional Value of the Protein Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispânica* L.). **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 1, p. 89-96, 2010.

OLMEDILLA-ALONSO, B.; JIMENEZ-COLMENERO, F.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p.919 - 930, 2013.

PAULA, M. M. D. O.; SILVA, J. R. G.; OLIVEIRA, K. L. D.; MASSINGUE, A. A.; RAMOS, E. M.; BENEVENUTO JÚNIOR, A. A.; SILVA, V. R. O. Technological and sensory characteristics of hamburgers added with chia seed as fat replacer. **Ciência Rural**, v.49, n.8, 2019.

POLKINGHORNE, R. J.; THOMPSON, J. M. Meat standars and grading: a world view. **Meat Science, Barking**, v. 86, p. 227-235, 2010.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2017. 473p.

ROCHA, Y. J. P. **Aplicação de fibra de ervilha em produtos cárneos**. 2015. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2015.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J. G.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. **Meat Science**, v. 89, n. 2, p. 166-173, 2011.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; MUÑOZ, C.; FUENTES, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SENDRA, E.; SAYAS, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Effect of tiger nut fiber on quality characteristics of pork burger. **Meat Science**, v. 85, n. 1, p. 70-76, 2010.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B.B.; SILVA, G. A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M. **Chronic non-communicablediseases in Brazil: burdenandcurrentchallenges**. v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHUH, V.; WEISS, J. Effects of carboxymethyl cellulose (CMC) and microcrystalline cellulose (MCC) as fat replacers on the microstructure and sensory characteristics of fried beef patties. **Food Hydrocolloids**, n. 45, p. 236–246, 2015.

SHAN, C. L.; DE BRUN, A.; HENCHION, M. L. C.; MURRIN, C.; WALL, P. G.; MONAHAN, F. J. Consumer evaluations of processed meat products reformulated to be healthier – A conjoint analysis study. **Meat Science**, n. 131, p. 82-89, 2017.

TALUKDER, S. Effect of dietary fiber on properties and acceptance of meat products: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n.1, p. 1005-1011, 2015.

VAN WEZEMAEL, L.; CAPUTO, V.; NAYGA, R. M.; CHRYSSOCHOIDIS, G.; VERBEKE, W. European consumer preferences for beef with nutrition and health claims: A multicountry investigation using discrete choice experiments. **Food Policy**, n. 44, p. 167-176, 2014.

VÁZQUEZ, O. A.; ROSADO, R. G.; CHEL, G. L.; BETANCUR, A. D. Propriedades físico-químicas de uma porção de fibra da Chia (*Salvia Hispânica*). **LTW – Ciência dos Alimentos e Tecnologia**, v. 42, p. 168 – 173, 2009.

VERMA, A. K.; SHARMA, B. D.; BANERJEE, R. Effect of sodium chloride replacement and apple pulp inclusion on the physico-chemical, textural and sensory properties of low fat chicken nuggets. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 715-719, 2010.

WEISS, J. *et al*. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 196-213, 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation**. Geneve, p. 72-78, 2003.

YAO, W.; LI, J.; WANG, J.J.; ZHOU, W. WANG, Q.; ZHU, R.; WANG, F.; THACKER, P.; Effects of dietary ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids on immunoglobulins, cytokines, fatty acid composition, and performance of lactating sows and suckling piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 43, 2012.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEERA, H.; LEE, E. J; AHN, D. U. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, n. 86, p. 15–31, 2010.

CAPÍTULO 2 - METABÓLITOS FÚNGICOS PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS: DESAFIO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Jéssica Beatriz da Silva Reis
Cleuber Antônio de Sá Silva
Maurilio Lopes Martins
André Narvaes da Rocha Campos

1. INTRODUÇÃO

Para que haja aumento no tempo de conservação e diminuição das perdas na pós-colheita de alimentos de origem vegetal, é importante que se conheça e utilize práticas adequadas de manuseio durante as fases de colheita, pós-colheita, armazenamento, transporte, distribuição, comercialização e consumo. A falta de cuidados nestas etapas pode provocar danos em frutas e hortaliças possibilitando o ataque de microrganismos deterioradores como fungos, bactérias e vírus, que constituem os principais contaminantes de vegetais (FREITAS-SILVA; SOUZA; OLIVEIRA, 2013).

As podridões em frutas e hortaliças, resultantes da atividade de agentes fitopatogênicos e da senescência natural, acarretam perdas qualitativas e quantitativas e, em consequência, perdas econômicas (COELHO et al., 2015). O valor das perdas pós-colheita de produtos agrícolas é de difícil mensuração a partir dos dados econômicos mundiais (COSTA; GUILHOTO; BURNQUIST, 2015).

As perdas econômicas na seção de frutas e hortaliças ocorrem principalmente pela colheita de frutos imaturos, controle de qualidade inadequado nas etapas da produção, incidência e gravidade de danos mecânicos, exposição a temperaturas inadequadas e demora no consumo (MELO et al., 2013). É apontada pela Associação Mineira dos Supermercados (AMIS), perdas no varejo da ordem de 750 milhões de reais por ano em alimentos (EVANS, 2015).

Assim, para minimizar perdas e garantir um produto de qualidade ao consumidor, vêm sendo utilizados produtos naturais no controle de doenças de plantas, apresentando eficiência na redução do uso de agrotóxicos (PEIXINHO; RIBEIRO; AMORIM, 2017).

2. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NA SAÚDE E NO AMBIENTE

Na década de 1960 a agricultura passou por grandes transformações que ficaram conhecidas como Revolução verde (GLIESSMAN, 2001). Esta nova lógica agrícola incluía práticas que favoreciam o desenvolvimento de patógenos e pragas, como a monocultura e as altas densidades de plantio. Estas transformações tornaram os cultivos comerciais de dependentes de um pacote tecnológico que envolve, invariavelmente, a utilização de agrotóxicos (GLIESSMAN, 2001).

A utilização de agrotóxicos é um tema que vem despertando interesse, tendo em vista suas consequências para a saúde humana, decorrentes de seu uso crescente e, às vezes, inadequado (MIORIN et al., 2016). Trabalhos demonstram que várias doenças como câncer e mal formações congênitas, podem ser provocadas mesmo passados anos ou décadas de exposição ao agrotóxico (CARNEIRO et al., 2015).

De acordo com relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2016), ao avaliar resíduos de agrotóxicos de 12.051 amostras, foram consideradas insatisfatórias 2.371 amostras (19,7%) e 2.211 (18,3%) apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Estes dados nos mostram que o risco potencial é eminente, já que o Limite Máximo de Resíduo (LMR) de agrotóxico para cada cultura agrícola é essencial para garantir que estes estão sendo adequadamente utilizados como também garantir a segurança alimentar.

Segundo Rangel, Rosa e Sarcinelli (2011), depois da própria alimentação, a principal fonte de exposição humana aos agrotóxicos é a ambiental, uma vez que estes produtos têm a capacidade de acumular-se no ar, água e solo, podendo, portanto, ter potencial de causar danos no decorrer do tempo.

3. CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS

O controle biológico de fitopatógenos refere-se ao uso de microrganismos que reduzem a atividade ou a sobrevivência dos agentes causadores de doenças em plantas (OWNLEY et al., 2010).

Os agentes antimicrobianos de controle biológico surgiram como uma alternativa mais efetiva do que o emprego dos diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado para o controle de fitopatógenos na pré e pós-colheita. Por serem considerados mais seguros à saúde e ao ambiente, esses agentes atendem à crescente demanda da sociedade pela diminuição do uso de agrotóxicos (ZUCCHI; MELO, 2009), e é apontada como uma alternativa viável, ecológica e economicamente sustentável para sistemas de produção agrícola (SOUZA et al., 2001; COMPANT et al., 2005).

O emprego de microrganismos para o controle de fitopatógenos pode ser direto, quando esses são utilizados vivos; ou indireto, através da aplicação de seus metabólitos. Em ambos os casos necessita-se obter produtos que mantenham as características dos microrganismos ou de seus metabólitos. Dessa forma, esses produtos precisam ser formulados para facilitar a comercialização, o transporte, a aplicação e o armazenamento, sem que ocorram alterações em suas características (LAZZARETT; BETTIOL, 1997).

3.1. Utilização de metabólitos fúngicos no combate de fitopatógenos

Os metabólitos secundários microbianos, derivados a partir de diferentes intermediários do metabolismo primário, representam uma grande fonte de compostos com atividades biológicas. Muitos dos produtos utilizados atualmente para consumo humano, ou terapias animais, são produzidos por fermentação microbiana ou são derivados a partir de modificação química de um produto microbiano. Desta forma, as novas substâncias bioativas continuam a ser identificadas a partir de fontes microbianas, em relação à grande variedade de isolados existentes (DONADIO et al., 2002).

De acordo com Vinale et al. (2008) muitas espécies microbianas são reconhecidamente produtoras de metabólitos secundários voláteis e não-voláteis, os quais apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana, com envolvimento de linhagens de espécies fúngicas na ativação de mecanismos de defesa da planta e na regulação do crescimento vegetal. O fungo *Trichoderma virens* é encontrado no solo, sendo de interesse para o biocontrole, pois apresenta capacidade de proteger as plantas e conter infestações por populações de patógenos sob diferentes condições de solo, pela produção de numerosos compostos biologicamente ativos, incluindo enzimas degradadoras de parede celular e metabólitos secundários. Acredita-se que essa interação evolui para uma simbiose entre o fungo e a planta, onde o fungo ocupa o nicho

nutricional e a planta é protegida de doenças. Indutores de *Trichoderma* ativam a expressão de genes da planta, que estão envolvidos no sistema de defesa, promovendo o crescimento da planta, incluindo o sistema radicular, aumentando a zona de colonização e os nutrientes disponíveis para o biocontrole do fungo, aumentando subsequentemente o antagonismo geral de patógenos de plantas (HANSON; HOWELL, 2004).

Lima et al. (1997) selecionaram fungos isolado a partir de frutos e vegetais. Em vários ensaios realizados em morangos, uva e kiwi, a levedura *Aureobasidium pullulans* L47 e as leveduras *Candida vanderwaltii* L60 e *C. oleophila* L66 mostraram-se eficazes no antagonismo de *Botrytis cinerra* e *Rhizopus stolonifer*. Os isolados L47 e L66 foram utilizados em ensaios de morangos cultivados em estufas. Eles foram aplicados no florescimento e na maturação dos frutos (antes e após a colheita) e observaram que o isolado L47 mostrou-se mais efetivo contra o *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Ambos os antagonistas eram mais ativos quando aplicado no estágio de florescimento. A população antagonista era consistentemente alta em flores e frutos em desenvolvimento e em morangos armazenados sobre refrigeração. Os isolados L47 e L66 apresentaram baixa sensibilidade em relação a alguns fungicidas na cultura e foram capazes de crescer nas temperaturas de armazenamento. A competição por nutrientes pareceu ser o principal modo de ação (LIMA et al., 1997).

De acordo com Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou potencial inibitório para o controle de doenças em vegetais, uma vez que possuiu capacidade de sintetizar antibióticos e a capacidade de competir por espaço e nutrientes. Entretanto, pouco se sabe quanto a sua ação sobre as podridões pós-colheita de frutas.

Pisolithus spp. são fungos ectomicorrízico, que vivem em simbiose com várias espécies de árvores, principalmente as do gênero *Eucalyptus* e *Pinus*. Esta simbiose tem grande importância para as árvores hospedeiras, principalmente quando plantadas em terrenos de baixa fertilidade, pois o fungo propicia a melhora na absorção e transporte de água e nutrientes do solo, aumentando a tolerância à acidez, toxidez de metais pesados, temperaturas elevadas do solo e aumenta a resistência às doenças do sistema radicular (DE SOUZA et al., 2001).

Alguns estudos mostram a importância de sua utilização em sistemas agrícolas, no período de pré e pós-colheita devido aos benefícios de seus metabólitos, principalmente

no controle de fungos patogênicos. Abreu (2012) observou forte antagonismo dos fungos ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius e P. microcarpus* sobre os fitopatógenos *B. cinerea* e *C. acutatum* pela produção de metabólitos pelos fungos esctomicorrízicos. Isolados de *Pisolithus* foram cultivados em meio de cultura BDA, sobre papel celofane. Após 0, 7, 14, 21 e 28 dias, o micélio desses fungos foi retirado e posteriormente os fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *C. acutatum* e *Phoma tarda* foram cultivados sobre os metabólitos liberados, realizando diariamente medições do crescimento micelial dos fungos fitopatógenos. Os resultados confirmaram inibição do desenvolvimento dos fitopatógenos no meio de cultura, sugerindo futuros experimentos acerca das substâncias atuantes e sua potencialidade de inibição.

Diante da necessidade do desenvolvimento de produtos naturais para redução do uso de agrotóxicos utilizados no controle de fungos fitopatogênicos na agricultura e a carência de estudos relacionados à toxicidade deles, faz se necessário o conhecimento detalhado sobre a efetividade dos metabólitos fúngicos de *Pisolithus* spp., uma vez que apresenta potencial de controle biológico alternativo.

3.2. Métodos de avaliação toxicológica

Uma forma de avaliar a segurança do uso dos metabólitos e extrato fúngicos é a realização de técnicas de bioensaio, que é uma ferramenta útil e complementar para avaliar o potencial tóxico de substâncias não regulamentadas e misturas químicas encontradas no meio ambiente (HERRERO et al., 2012).

Ao avaliar o potencial de toxicidade de compostos químicos, algumas características devem ser consideradas, como: a possível utilização em estudos de modelagem, a avaliação de risco, a possibilidade de seleção de grupos para estudos instrumentais, a constituição de uma base para a avaliação dos riscos das substâncias químicas e dos seus produtos de transformação. Neste contexto, as técnicas escolhidas devem ser amplamente estudadas, confiáveis, econômicas, de fácil execução e sensibilidade de acordo com a amostra avaliada (WIECZERZAK; NAMIEŚNIK; KUDLAK, 2016).

No entanto, ao avaliar os danos ocasionados por uma substância em um organismo vivo, deve-se observar a combinação de diversos fatores, tais como a espécie, idade e sexo. A exposição às substâncias tóxicas, como certos contaminantes, estando

diretamente associada à morte celular, quer por apoptose ou necrose, revelam suas propriedades citotóxicas. Além do potencial citotóxico, os contaminantes podem apresentar um potencial genotóxico, mutagênico e carcinogênico (VICENTE, 2012).

Os ensaios de citotoxicidade avaliam a capacidade que uma substância tem de causar danos à célula ou sua estrutura, podendo culminar em sua morte. Essa avaliação pode ser realizada por meio de alterações no processo de divisão celular como por modificações no índice mitótico (MACHADO SOUZA et al., 2005; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

A avaliação de genotoxicidade se caracteriza por métodos que avaliam lesões cromossomais ou na estrutura nuclear (OSIMITZ et al., 2013). Para ocasionarem danos ao DNA da célula, é necessário que o agente tóxico seja transportado através das membranas celulares e/ou nucleares, interferindo em seu controle nas mais diversas atividades da célula, como reações enzimáticas, redução dos níveis de sequestrante de radicais e a capacidade de reparo das células (BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011).

A mutagenicidade se refere à capacidade de uma substância em induzir danos genéticos, ocorrendo em diversos mecanismos relacionados às interações com o DNA e outros alvos, como proteínas (BENIGNI; BOSSA; 2011). Sua avaliação é o primeiro passo para a identificação de riscos e dos compostos, por serem simples em relação a avaliação de carcinogenicidade (GADALETA et al., 2016).

3.2.1. Teste de raiz de cebola (*Allium cepa*)

O bioensaio com vegetais são considerados essenciais para o uso ambiental de substâncias não regulamentadas e misturas químicas (FREIRE et al., 2016), sendo adequados e rápidos para o monitoramento de efeitos tóxicos (HERRERO et al., 2012).

Considerado de baixo custo e fácil manipulação, o ensaio com *Allium cepa* permite a avaliação de três efeitos: citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, possuindo elevada sensibilidade comparada aos testes mais comuns e padronizados, como de AMES (LUTTERBECK et al., 2016). É também utilizado como estudos precedentes para o teste *in vivo*.

A raiz de cebola (*A. cepa*) é um eficiente bioindicador de citotoxicidade (SABINI et al., 2011) e tem mostrado ser altamente sensível ao estresse ambiental (CHARLES et al., 2011; ABREU et al., 2014). Rotineiramente utilizados como um dos principais ensaios

necessários a avaliação *in vivo* do potencial citotóxico e genotóxico de produtos químicos e/ou amostras ambientais (VIJAYALAKSHMIDEVI, 2015), o teste realizado em *A. cepa* é uma excelente ferramenta, considerado padrão para testes de rápida detecção de toxicidade (KUMARI, 2016).

O teste caracteriza-se por apresentar facilidade no manuseio, utilização em amostras sem qualquer pré-tratamento, ser um sistema eucarioto que confere maior grau de proximidade na comparação com os prováveis efeitos causados na biota exposta a substâncias tóxicas (ANDRADE, 2012), crescimento rápido de suas raízes, além da disponibilidade e requisito de mínima instalação, tornando-o desejável para o monitoramento rápido de genotoxicidade (BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011).

O teste é um método direto, confiável, eficiente e de boa aceitação para acompanhar o dano em sistemas que são expostas aos agentes mutagênicos ou potenciais agentes carcinogênicos, tido como o melhor organismo modelo para estudar toxicologia genética de nano partículas (KUMAR; SHARMA; PANDEY, 2011).

O teste genotóxico utilizando o *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (GRIPPA et al., 2010), caracterizado como o melhor para avaliar anormalidades cromossômicas e nucleares, índice mitótico, formação de micronúcleos, detecção de contaminantes, além de permitir a avaliação da ação de um agente e seus efeitos clastogênico sobre o material genético (AIUB; FELZENSWALB, 2011).

O teste com raiz de cebola (*A. cepa*) apresenta boa correlação com outros sistemas de teste, por ter um número reduzido de cromossomos (2 n = 16) (FISKESJÖ, 1985). O cariótipo de *A. cepa* consiste em oito pares de cromossomos, entre metacêntricos e submetacêntricos. Cada bulbo produz uma grande quantidade de raízes em um período, fornecendo um número maior de células em divisão por lâmina sustentando sua utilização para análise de citotoxicidade (SILVA; BOSSO; CARDOSO, 2010).

Além disso, este ensaio proporciona informação sobre a citotoxicidade de vários agentes pela análise do Índice Mitótico (IM) (BIRUK et al., 2017), formação de micronúcleos e células binucleadas, com a demonstração de resultados claros e positivos em condições experimentais, sendo notável a aberração cromossômica juntamente com a formação de cromossomas errantes (GUPTA; AHMAD, 2012).

3.2.2. Teste de Ames

Em 1976, Ames e colaboradores examinaram cerca de 300 compostos, entre os quais foram conhecidos cancerígenos humanos, bem como substâncias não carcinogênicas. Estes estudos demonstraram a utilidade de um teste baseado em bactérias de *Salmonella typhimurium* como uma ferramenta para a avaliação preliminar do potencial carcinogênico de compostos em amostras de água, dado que a maioria dos agentes cancerígenos causavam mutações nas bactérias (MCANN; AMES, 1976).

Ensaios que utilizam organismos unicelulares como bactérias têm enormes vantagens. Nos ensaios mutagênicos são necessárias grandes quantidades de células vivas, facilmente conseguido com a utilização de células bacterianas. Estes sistemas são simples, permitem testes rápidos e são relativamente de baixo custo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; DEHGHAN-NOODEH et al., 2013).

O teste de Ames é utilizado em todo o mundo como um ensaio de rastreio para determinar o potencial mutagênico de diversos produtos químicos e drogas, sendo empregado para a apresentação de dados para as agências reguladoras para o registo ou a aceitação de muitos produtos químicos, incluindo drogas e biocidas (BANERJEE et al., 2013). Adicionalmente, caracteriza-se por ser um método rápido e eficaz, barato e relativamente fácil para induzir mutações por produtos químicos *in vitro* (LI, 2013a).

O teste é realizado a partir das estirpes bacterianas de *S. typhimurium*, com quantidades mínimas de L-histidina, e, opcionalmente, a fracção microssomal S9 de fígado de rato. Após a incubação, o número de colônias de bactérias é contado, sendo que elevada contagem pode indicar a forte mutagenicidade dos compostos na amostra (KWASNIEWSKA et al., 2012).

Ao utilizar diferentes estirpes de bactérias, é possível detectar diferentes mecanismos de mutação. Por exemplo, a *S. typhimurium* TA 100, TA 102, TA 1535 e estirpes podem ser utilizadas para detectar substituições de pares de bases únicos (RESENDE et al., 2012).

Resultados positivos de ensaio citogenético de mamífero em teste *in vivo*, podem ser confirmadas pelo teste de Ames. Porém, ao avaliar um risco de potencial genotóxico devido a exposição de produtos químicos, este bioensaio é limitado, sendo o teste de aberração cromossômica da célula de mamífero, como ensaio de micronúcleo, preferencialmente utilizado (KIRKLAND et al., 2014).

O bioensaio de Ames, permite avaliar doses pequenas a partir de diluições da substância em estudo (fator de diluição 1:1,4), porém, para o emprego do teste, a viabilidade das cepas utilizadas devem estar com concentração de células a partir de 10^9 UFC/mL (DI SOTTO et al., 2013).

A combinação do teste de Ames e ensaio de micronúcleo demonstra ser eficaz para revelar carcinogêneos e genotoxinas, de modo que, quando os resultados de ambos são negativos, outro ensaio *in vivo* não precisa ser realizado (KIRKLAND et al., 2014).

3.3.3 Teste com *Artemia salina*

Artemia salina é um micro crustáceo da classe *Anostracea*, muito utilizado como fonte de alimento para peixes e outros crustáceos; se adaptada a grandes mudanças ambientais, como variações na salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido (MORAIS, 2012). É um organismo fotossensível, sendo a larva a que apresenta melhor sensibilidade a substâncias tóxicas e consideradas um indicador de toxicidade em testes *in vivo* (GARCIA; GOLVEIA; SANTIAGO, 2014).

O bioensaio realizado com esse organismo é frequentemente empregado em análises prévias de toxicidade geral ou como primeira análise de modificações celulares de novos compostos. Alguns estudos correlacionam o ensaio de toxicidade em larvas de *Artemia salina* com atividades antiviral, bactericida, fungicida e parasiticida, o que mostra o amplo campo de efetividade da técnica (GARCIA; GOLVEIA; SANTIAGO, 2014).

O teste com *Artemia salina* é muito utilizado em ensaios toxicológicos por ser de baixo custo, fácil cultivo e obtenção (BEDNARCZUK et al., 2010). Estas características possibilitam a realização de experimentos com maior rapidez e sem grandes dificuldades de manipulação, sendo um método simples de triagem de toxicidade (MOTTI; ANDRADE PORTO; ROEL, 2015).

A utilização do bioensaio em *Artemia salina*, assim como o teste de raiz de cebola, servem de base para os ensaios biológicos com ratos.

3.3.4. Teste *in vivo*

Os testes *in vivo* para danos genéticos devem ser um modelo que propicie algumas características quanto à absorção, distribuição, metabolismo e excreção (KANG et al.,

2013). São realizadas em diversos organismos como: roedores, peixes, crustáceos, rotíferos, invertebrados, entre outros (REPETTO, 2013; LUO et al., 2014).

A exposição prolongada do agente tóxico é uma desvantagem para o teste *in vivo*. Porém neste bioensaio é possível avaliar a localização e a concentração do material em questão nos tecidos, bem como a taxa de excreção, além da avaliação macroscópica do tecido e toxicidade sistêmica em geral (KANG et al., 2013).

As informações coletadas da análise de órgãos são essenciais para garantir a aplicação segura do composto estudado e fornecer informações sobre os efeitos tóxicos e genotóxico de longo prazo que são necessários para estudos clínicos (PENG; ZHANG; ZHOU, 2016). Estudos adicionais de toxicidade pré-clínicos, são necessários para confirmar a segurança de compostos para uso em longo prazo e verificar o efeito toxicológico no corpo humano.

Além disso, a avaliação da bioquímica do sangue é considerada uma ferramenta útil para o diagnóstico de doenças hepáticas e avaliar os estudos histopatológicos (KOUROUMA, 2015). Em estudos *in vivo*, podem-se avaliar as doses empregadas, relacionando com o tipo e características das lesões no organismo. A desvantagem deste teste é o tempo para a realização do experimento.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A avaliação toxicológica de substâncias para fins alimentícios é de extrema importância, visto que os danos que podem ser ocasionados à saúde são inúmeros. Por serem análises de baixo custo, verificamos que testes como o da raiz de cebola e o da *Artemia salina*, podem ser executados e adaptados a análises de alimentos para a verificação preliminar de toxicidade de novos compostos.

5. REFERÊNCIAS

ABREU, M. M.; LOPES, J.; SANTOS, E. S.; MAGALHÃES, M. C. F. Ecotoxicity evaluation of an amended soil contaminated with uranium and radium using sensitive plants. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 142, p. 112-121, 2014.

ABREU, V. P de. **Antagonismo *in vitro* de isolados de *Pisolithus* spp. sobre fungos fitopatogênicos**. 2012. 37 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agroecologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2012.

AIUB, C. A. F.; FELZENSWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Revista Genética na Escola**, v. 6, p. 12-15, 2011.

ANDRADE, B. R. G. **Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos UV e UV/H_2O_2.** 2012. 194 f. Tese (Doutorado Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of Allium and Nicotiana in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, p. 860-865, 2011.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; POLICEGOUDRA, R.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A.; VEER, V. Evaluation of the mutagenic potential of a combinational prophylactic transdermal patch by Ames test. **Immuno-analyse e Biologie Spécialisée**, v. 28, p. 322-326, 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA:** Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília, 2016. 246 p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Relat%C3%B3rio+PARA+Vers%C3%A3o+Final/1230de7d-306d-4249-a62c-a68708fab153. Acesso em: 04 junho 2018.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v. 11, p. 43-50, 2010.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2507-2536, 2011.

BIRUK, L. N.; MORETTON, J.; LORIO, A. F.; WEIGANDT, C.; ETCHEVERRY, J.; FILIPPETTO, J.; MAGDALENO, A. Evaluation of toxicity and genotoxicity in sediments of the Matanza Riachuelo basin (Argentina), under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 302-311, 2017.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G.S.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Expressão Popular, 2015. 624 p.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P. M.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, p. 2057-2064, 2011.

COELHO, C. C. S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 369–375, 2015.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4951-4959, 2005.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M.; BURNQUIST, H. L. Impactos Socioeconômicos de Reduções nas Perdas Pós-colheita de Produtos Agrícolas no Brasil. **Revista Economia Sociologia Rural**, Brasília, v. 53, p. 395-408, 2015.

DE SOUZA, A. M., DE CARVALHO, D., DA SILVA ROSADO, S. C.; SALES, N. D. L. P. Caracterização morfológica e isoenzimática de isolados de *Pisolithus* spp. **Cerne**, v. 7, p. 22-34, 2001.

DEHGHAN-NOODEH, G.; SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M. H., BEHRAVAN, E.; DEHGHAN-NOODEH, A.; REZAEI-GHARAEEI, R. Antimutagenicity activity of different fractions of *Zataria multiflora*, *Achillea wilhelmsii* and *Camellia sinensis* using Ames test. **Journal of Medical Sciences**, v. 13, p. 459, 2013.

DI SOTTO, A.; MAFFEI, F.; HRELIA, P.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MAZZANTI, G. Genotoxicity assessment of β-caryophyllene oxide. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, p. 264-268, 2013.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 187-198, 2002.

EVANS, L. Supermercados de Minas descartam 450 mil quilos de alimentos todos os meses. EM.com.br, Belo Horizonte, 24 ago. 2015. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2015/08/24/internas_economia,681236/supermercados-de-minas-descartam-450-mil-quilos-de-alimentos-todos-os.shtml. Acesso em: 10 out. 2018.

FISKESJÖ, GEIRID. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters,** v. 160, p. 171-177, 2006.

FREIRE, P. F.; PEROPADRE, A.; ROSAL, R.; MARTÍN, J. M. P.; HAZEN, M. J. Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 563, p. 899-903, 2016.

FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. M. M. Potencial da ozonização no controle de fitopatógenos em pós-colheita. In: LUZ, W. C. da. (org.). **Revisão anual de patologia de plantas.** 1.ed. Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 2013. p. 96-130.

GADALETA, D.; MANGANELLI, S.; MANGANARO, A.; PORTA, N.; BENFENATI, E. A knowledge-based expert rule system for predicting mutagenicity (Ames test) of aromatic amines and azo compounds. **Toxicology**, v. 370, p. 20-30, 2016.

GARCIA, L. F.; GOLVEIA, J. C. S.; SANTIAGO, M. F. Avaliação do potencial toxicológico de hormônios sexuais sintéticos utilizando bioensaios. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 58-75, jun. 2014.

GLIESSMAN, S. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2001. 653 p.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

GUPTA, A. K.; AHMAD, M. Assessmentof cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 201-202, p. 92-99, 2012.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma viren*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 171-176, 2004.

HERRERO, O.; MARTÍN, J. P.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1, p. 20-24, 2012.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal Cancer Prevention**, v. 18, p. 277-288, 2013.

KIRKLAND, D.; ZEIGER, E.; MADIA, E.; GOODERHAM, N.; KASPER, P.; LYNCH, A.; MORITA, T.; OUEDRAOGO, G.; PARRA MORTE, J. M.; PFUHLER, S.; ROGIERS, V.; SCHULZ, M.; THYBAUD, V.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WORTH, A.; CORVI, R. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775, p. 55-68, 2014.

KOUROUMA, A.; KEITA, H.; PENG, D.; QUAN, C.; BILIVOGUI, K. K.; QI, S.; NDJIEMBI, A. C.; OSAMUYIMEN, A.; YANG, K. Effects of 4-nonylphenol on oxidant/antioxidant balance

system inducing hepatic steatosis in male rat. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1423-1433, 2015.

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S. Cypermethrin induced alterations in nitrogen metabolism in freshwater fishes. **Chemosphere**, v. 83, p. 492-501, 2011.

KUMARI, V.; YADAV, A.; HAQ, I.; KUMAR, S.; BHARAGAVA, R. N.; SINGH, S. K; RAJ, A. Evaluation of the genotoxicity of the recently reduced *Bacillus cereus* treated tannery effluent with hexavalent chromium. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 204-211, 2016.

KWASNIEWSKA, J.; NAŁĘCZJAWECKI, G.; SKRZYPCZAK, A.; PLAZA, G. A; MATEJCZYK, M. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 75, p. 55- 62, 2012.

LAZZARETT, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia agricola**, v. 54, n. 1-2, p. 89-96. 1997.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10 n. 2, p. 169-178, 1997.

LUTTERBECK, C. A.; WILDE, M. L.; BAGINSKA, E.; LEDER, C.; MACHADO, E. L.; KUMMERER, K. Degradation of cyclophosphamide and 5-fluorouracil by UV and simulated sunlight treatments: Assessment of the enhancement of the biodegradability and toxicity. **Environmental pollution**, v. 208, p. 467-476, 2016.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F.I.; ZHANG, J.; SHUANG, L.; WANG, X.C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473, p. 619-641, 2014.

MACHADO SOUZA, S. A.; STEIN, V. C.; VESZ CATTELAN, L.; BOBROWSKI, V. L.; GOMES ROCHA, B. H. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2005. Disponível em: https://www.redalyc.org/pdf/500/50050101.pdf. Acesso em: 07 junho 2020.

MCANN, J.; AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in *Salmonella* test/microsome: Test of 300 chemicals: Discussion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, p. 950-954, 1976.

MELO, E. L.; LOPES, J. S.; DEODORO, R. N.; MARUYAMA, U.; GUIMARÃES, A. A. O desafio do planejamento de demanda no setor hortifrutigranjeiro: um estudo de caso da Empresa Nova Casbri. *In*: SIMPÓSIO DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E TECNOLOGIA,

2013, Alagoas. **Anais** [...]. Alagoas: UFAL, 2013. Disponível em: https://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos13/45318548.pdf. Acesso em: 12 jul. 2020.

MIORIN, J. D.; CAMPONOGARA, S.; DIAS, G. L.; SILVA, N. M. da; VIERO, C. M. Percepções de agricultores sobre o impacto dos agrotóxicos para a saúde e o meio ambiente **Revista Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**, v. 6, p. 2410-2420, 2016.

MORAIS, R. L. **Remoção de hormônios sexuais sintéticos por carbonização hidrotermal e por fungos de decomposição branca**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. A. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 29-60, 2000.

MOTTI, P. R.; ANDRADE PORTO, K. R.; ROEL, A. R. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. **Multitemas**, n. 47, p. 9-19, 2015.

OSIMITZ, T. G.; DROEGE, W.; BOOBIS, A. R.; LAGO, B.G. Avaliação da utilidade do bioensaio de ratos ao longo da vida na identificação de riscos de câncer para humanos. **Toxicologia alimentar e química**, v. 60, p. 550-562, 2013.

OWNLEY, B. H.; GWINN K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113–128, 2010.

PEIXINHO, G. de S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. da R. Action of the essential oil of mint (*Mentha arvensis*) on the pathogen *Lasiodiplodia theobromae* in bunches of grapevine cv. Itália. **Summa phytopathol**, v. 43, n. 1, p. 32-35, 2017.

PENG, K.; ZHANG, S. Y.; ZHOU, H. L. Toxicological evaluation of the extract rich in flavonoids of maydis stigma: studies of subchronic toxicity and genotoxicity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p.161-169, 2016.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

RANGEL, C. F.; ROSA, A. C. S.; SARCINELLI, P. N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 19, p. 435-442, 2011.

RANIERI, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; OLIVEIRA, J. S. B.; MESQUINI, R. M.; CLEMENTE, E.; CRUZ, M. E. S. Utilização de compostos bioativos de plantas medicinais na pós-colheita de tomate. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 160-165, 2015.

REPETTO, G. Test Batteries in Ecotoxicology. In: Férard, J. F.; Blaise, C. (ed.). **Encyclopedia of aquatic Ecotoxology**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 1105-1128.

RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5255-5268, 2012.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBARA, F. M.; BACHETTI, R. A.; SUTIL S. B.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI L. I. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from Achyrocline satureioides by *Allium cepa* test. **Natural product communications**, v. 6, n. 7, p. 995-998, 2011.

SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 9, n. 1, p. 67-70, 2010.

SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S.; SALES, N. L. P. Caracterização morfológica e isoenzimática de isolados de *Pisolithus* spp., **CERNE**, v. 7, n. 2, p. 022-034, 2001.

STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. D. S., NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 11, n. 3, p.16-21, 1999.

VICENTE, A. M. M. **Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

VIJAYALAKSHMIDEVI, S. R.; MUTHUKUMAR, K. Improved biodegradation of textile dye effluent by coculture. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 23-30, 2015.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. Trichoderma plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008.

WIECZERZAK, M.; NAMIEŚNIK, J.; KUDŁAK, B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. **Environment International**, v. 94, p. 341-361, 2016.

ZUCCHI, T. D., MELO, I. S. Controle biológico de fungos aflatoxigênicos. *In*: BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. (ed.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 69-74.

CAPÍTULO 3 - PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL CONTENDO BACTÉRIAS PROBIÓTICAS COM ÊNFASE EM VEGETAIS FERMENTADOS

Priscilla Araújo Campos
Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos
Maurilio Lopes Martins
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
Eliane Maurício Furtado Martins

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observou-se um aumento na busca dos consumidores por uma alimentação menos processada, sem conservantes e que auxilie na prevenção de doenças. O aumento do interesse por esses alimentos é, muitas vezes, decorrente do cotidiano agitado e da preocupação com a qualidade de vida. A publicação "Brasil Food Trends 2020" da Federação das Indústrias do estado de São Paulo (FIESP) e do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) mostrou que 21% da população brasileira se preocupa com saúde e bem-estar promovidos pelos alimentos. Em 2016, pesquisas realizadas pelas mesmas instituições demonstraram que mais de 80% dos entrevistados procuram consumir alimentos mais nutritivos (REGO, 2016).

Para atender essa demanda, empresas e empreendedores têm buscado alternativas para o desenvolvimento de produtos alimentícios diferenciados e de valor agregado, o que contribui para criação de novos nichos de mercado, constituído por alimentos mais naturais. Além disso, pesquisas sobre alimentos funcionais que, além da nutrição básica, conferem alguns efeitos metabólicos e fisiológicos ao organismo ao serem consumidos na dieta, é cada vez maior.

Os probióticos se enquadram entre os ingredientes funcionais e, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, eles são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (FAO/WHO, 2001).

São inúmeros os benefícios atribuídos ao consumo de culturas probióticas e, em decorrência desses efeitos benéficos, há um aumento na procura por alimentos lácteos e não lácteos probióticos. Os produtos lácteos oferecem boas condições para os microrganismos probióticos, entretanto, existe a necessidade de produtos probióticos não

lácteos (MARTINS et al., 2013), a fim de atender uma parcela da população que apresenta restrições na dieta. Vegetais fermentados com bactérias láticas probióticas são encontrados mundialmente na forma de molhos, pastas, dentre outros e podem ser consumidos como alimentos em conserva, vinagretes, etc.

Nosso grupo de pesquisa no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos vem avaliando o potencial de diferentes frutas e hortaliças como carreadoras de bactérias probióticas, a exemplo de Lactobacillus plantarum e Lactobacillus rhamnosus e os resultados são promissores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alimentos funcionais probióticos e seu estudo *in vitro* em matrizes vegetais

Nos últimos anos, os consumidores têm demonstrado interesse nos benefícios dos alimentos para a saúde (MARINO et al., 2017) e, consequentemente, a população vem buscando incorporar hábitos saudáveis à sua rotina. Assim, a demanda por produtos funcionais, que exercem efeito específico sobre a saúde devido à sua constituição química tem sido prioridade de alguns consumidores (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013) e foco de pesquisa e investigação, o que é constatado pelo aumento do número de trabalhos científicos associados a este assunto (PERRICONE et al., 2015; KAUR; SINGH, 2017).

Diversos fatores são reconhecidos como principais responsáveis pela disseminação dos alimentos funcionais, como as informações sobre o elevado consumo de alimentos industrializados, problemas de saúde decorrentes do estilo de vida agitado, sedentarismo, aumento da incidência de automedicação e, sobretudo, aumento da consciência da relação entre dieta e saúde (CORBO et al., 2014).

A legislação brasileira não define alimento funcional, mas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu e padronizou alegações, condicionando o benefício alegado pelo consumo do alimento à adoção de uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis (STRINGHETA; AQUINO; VILELA, 2010).

Diversos alimentos com alegações funcionais estão sendo desenvolvidos como, por exemplo, aqueles contendo probióticos, que são microrganismos vivos que mediante

a ingestão de determinado número apresentam efeito benéfico sobre a saúde humana (FAO/WHO, 2001). Constituem-se de leveduras ou bactérias que auxiliam na recolonização e restauração da simbiose da microbiota intestinal, sendo veiculados em alimentos funcionais (CHAUHAN; CHORAWALA, 2012).

O cenário econômico global dos probióticos é bastante incentivador e o segmento de alimentos e bebidas, que é composto por laticínios e produtos não lácteos, cereais, produtos fermentados e desidratados representara mais de 85% da receita total (EVANS; ZAKARIA; GUTHRIE, 2016). Acredita-se que esse crescimento está relacionado à conscientização e preocupação dos consumidores com a dieta.

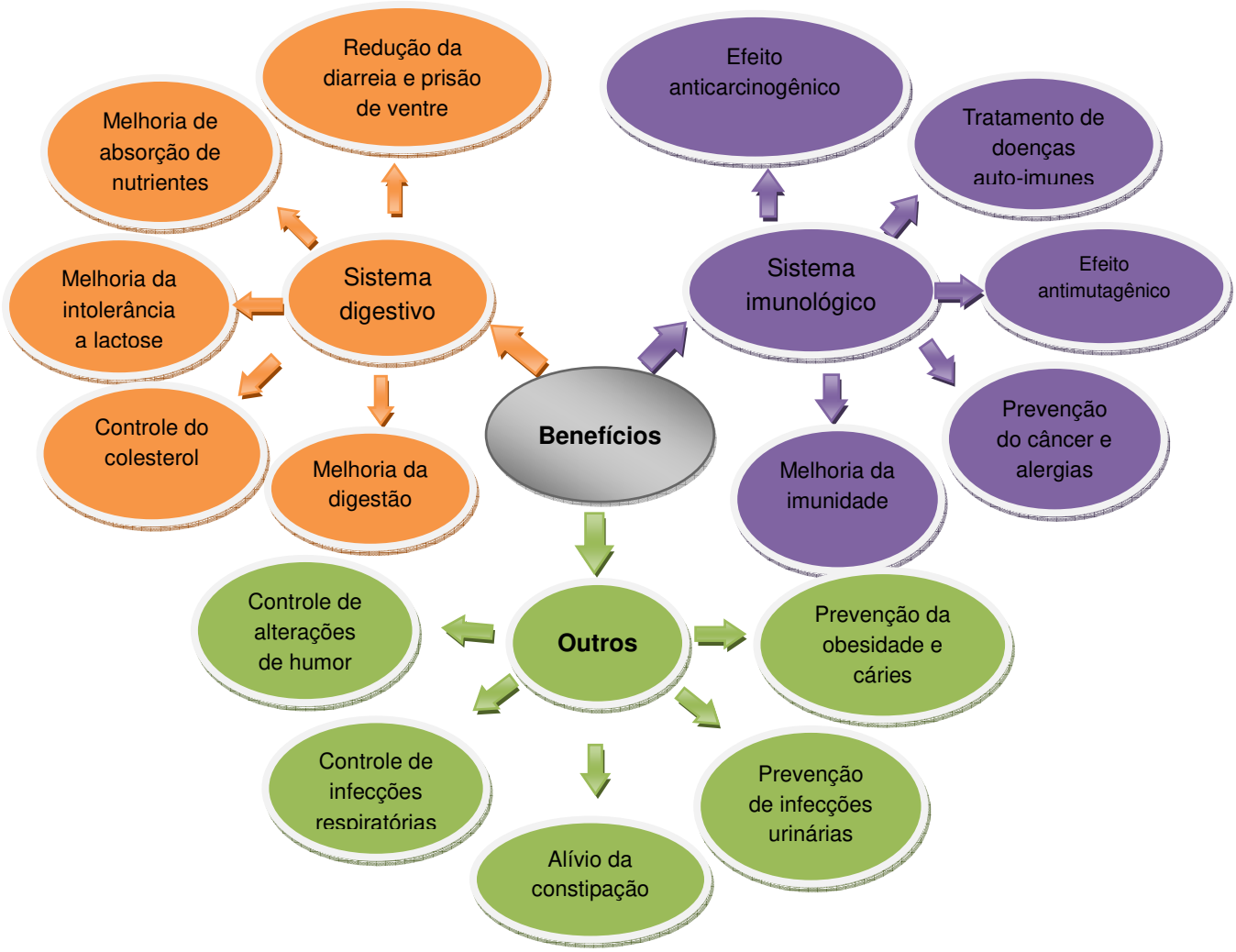
A ingestão de alimentos probióticos proporciona vários benefícios, dentre eles estão os relacionados à preservação fisiológica das funções do trato gastrointestinal e do sistema imunitário, entre outros (Figura 1).

Além dos benefícios que as culturas probióticas promovem à saúde quando consumidas, também desempenham uma função protetora durante o armazenamento contra os agentes deterioradores e patogênicos dos alimentos. Essa função protetora é atribuída à competição por nutrientes (vitaminas, minerais, oligoelementos e peptídeos) e produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos) e compostos voláteis, não voláteis e aromáticos (PENNA; TODOROV, 2016). Assim, a presença de culturas com atividade inibidora é capaz de estender a vida de prateleira e a segurança dos produtos.

O uso de bactérias probióticas como promotoras de benefícios clínicos à saúde é uma área de pesquisa fascinante que ainda necessita de exploração (KERRY et al., 2018). No entanto, não existe um consenso da quantidade mínima do probiótico a ser ingerida para que se possa comprovar sua funcionalidade . Segundo Argyri et al. (2013), o produto deve conter pelo menos 7,0 Log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias viáveis por grama para promover os benefícios. Já as diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO, 2017) sugerem que a dose de probióticos necessária varia muito em função da cepa e do produto. Embora muitos produtos comercializados forneçam entre 1–10 bilhões de UFC/dose, o que equivale a 9,0 – 10 Log de UFC/dose, alguns produtos demonstraram ser eficazes em níveis mais baixos, enquanto outros requerem quantidades maiores. Portanto, não é possível estabelecer

uma dose geral necessária de probióticos; a dose deve ser baseada em estudos com seres humanos que mostram benefícios para a saúde.

Figura 1: Benefícios do consumo de probióticos relatados cientificamente.



Fonte: Gueimonde e Salminen (2013); Tripathi e Giri (2014); Salminen, Kneifel e Ouwehand (2016); Panghal et al. (2018).

A quantidade de probióticos presente no produto também é influenciada pela composição da matriz e condições de processamento, sendo que a sua estabilidade a essas condições pode ser alterada pela elevada temperatura de processamento, temperatura de incubação, temperatura de enchimento, taxa de resfriamento, sólidos totais do produto, equipamentos de envase, materiais de embalagem e condições de armazenamento (PERRICONE et al., 2015). Outros parâmetros como a proporção de inoculação, níveis de oxigênio, pH, acidez, atividade de água, presença de sal, açúcar,

bacteriocinas e produtos químicos como o peróxido de hidrogênio, aromatizantes artificiais e corantes afetam a sua viabilidade (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Dessa forma, o desenvolvimento de alimentos probióticos com a concentração adequada de microrganismos até o momento do consumo é um desafio, considerando que para uso humano é imprescindível que este apresente capacidade de resistir ao ambiente gastrointestinal, sendo estável na presença de ácido e bile, apresente adesão e persistência para resistir a agentes patogênicos por meio da produção de substâncias antimicrobianas, etc (KOMATSU; BURITI; SAAD 2008; TULINI; WINKELSTROTER; DEMARTINIS, 2013). Para isso, de acordo com Galgano et al. (2015), elevadas contagens de células viáveis devem prevalecer ao longo da vida útil do produto.

Estudos clínicos baseados em ensaios in vivo e in vitro são necessários para considerar o produto probiótico. Muitos estudos in vitro simulando a digestão gastrointestinal têm sido conduzidos em alimentos de base não láctea, a fim de testar diferentes matrizes como carreadoras de bactérias probióticas (Tabela 1).

Esses estudos empregam várias enzimas como α-amilase, pepsina, lipase, bile bovina e pancreatina de diferentes fontes, tais como de origem suína, de coelho ou humana, diferindo em sua atividade e caracterização, a fim de simular as fases oral, gástrica, entérica I e entérica II do ensaio in vitro (MINEKUS et al., 2014).

Os estudos in vitro são amplamente utilizados e, quando comparados ao ensaio in vivo, são métodos mais rápidos, seguros e não possuem as mesmas restrições éticas como nos testes in vivo, sendo uma metodologia eficiente para avaliar o carreamento de probióticos ao longo do TGI (CAMPOS et al., 2019a). Ferrando et al. (2016) avaliaram duas estirpes de L. plantarum (Lp 813 e Lp 998) e constataram que ambas mostraram uma boa resistência à passagem no trato gastrointestinal, reduzindo 3,5 e 4,0 ciclos Log na contagem de células viáveis, permanecendo, assim, com aproximadamente 106 e 105 UFC/mL, respectivamente.

Na literatura encontram-se disponíveis poucos trabalhos que relatam à adição de bactérias probióticas em aperitivos a base de vegetais, sendo ainda mais escassos os estudos que avaliam a resistência desses microrganismos às condições gastrointestinais in vitro e in vivo.

Não há dúvida de que os probióticos ganharam espaço nas prateleiras dos supermercados e o aumento dessa demanda está intimamente relacionado aos avanços

científicos em nutrição, farmacologia, ciência e tecnologia de alimentos, além da microbiologia de alimentos. A integração desses campos aumentou nosso conhecimento em relação aos efeitos dos probióticos na saúde humana e na fabricação de alimentos potencialmente funcionais.

Tabela 1 - Estudos *in vitro* de viabilidade de microrganismos probióticos veiculados por frutas, hortaliças e derivados.

Matriz	Probiótico			Referência
	Espécie	Viabilidade (UFC/g ou mL)	Tempo (dias)	
Kimchi	*L. plantarum* 299v	10^7	-	Ji et al. (2013)
Azeitona	*L. pentosus* e *L. plantarum*	> 10^6	5	Blana et al. (2014)
Suco de laranja em pó	*L. plantarum*	10^7	180	Barbosa; Borges; Teixeira (2015)
Fermentado de rabanete	*L. plantarum, L. rhamnosus* GG e *L. pentosus*	> 10^7	-	Damodharan; Palaniyandi; Yang (2015)
Maçã em cubos	*L. plantarum*	10^7	6	Emser et al. (2017)
Suco de Manga	*L. acidophilus, L. plantarum e L. rhamnosus* GG	> 10^5	28	Furtado (2017)
Bebida de leguminosas, goiaba e beterraba	*L. rhamnosus* GG	> 10^5	45	Montanari (2017)
Suco de jabuticaba	*L. rhamnosus* GG	10^6	28	Oliveira et al. (2017)
Suco misto de juçara e manga	*L. rhamnosus* GG	> 10^4	28	Prates (2017)
Cenoura e goiaba minimamente processadas	*L. acidophilus, L. plantarum* e *L. paracasei*	> 10^6	12	Rodrigues (2017)
Suco de Juçara e abacaxi	*L. rhamnosus* GG	10^6	28	Campos et al. (2019a)
Antepasto de vegetais	*L. plantarum* LP 299v e *L. rhamnosus* GG	> 10^6	90	Campos et al. (2019b)

Fonte: dos autores; (-) não informado.

2.2. Principais gêneros de bactérias probióticas e espécies mais usadas em produtos de origem vegetal

Estudos sobre microrganismos probióticos vêm aumentando significativamente ao longo dos anos. De janeiro a agosto de 2014, foram divulgados 1476 trabalhos relacionados aos efeitos benéficos do consumo de probióticos à saúde humana. Em 2019, 2652 artigos foram encontrados no "Science direct" relacionados aos beneficios do seu consumo e 3034 artigos publicados no mesmo ano, tiveram como foco probióticos em alimentos, o que demonstra a importancia do tema.

Os microrganismos probióticos mais empregados em alimentos e que estão presentes no mercado são os pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MARTINS et al., 2013; DAVIS, 2014). Estes dois gêneros são habitantes predominantes do intestino humano, sendo *Lactobacillus* no intestino delgado e *Bifidobacterium*, no intestino grosso (TRIPATHI; GIRI, 2014).

As espécies do gênero *Bifidobacterium* são as mais utilizadas para consumo humano, em função de seus efeitos na prevenção e tratamento de alguns distúrbios. São microrganismos sacarolíticos e sua capacidade de utilizar carboidratos varia entre as diferentes estirpes (VARELA; MADIEDO; GUEIMONDE, 2017). O *habitat* natural de algumas estirpes de *Bifidobacterium* é o trato gastrointestinal (LUGLI et al., 2014). São Gram-positivos (SOCCOL et al., 2010), anaeróbicos, não produtores de esporos, catalase negativa e sensível a pH abaixo de 5,0. O gênero *Bifidobacterium* é constituído por mais de 35 espécies, sendo as mais utilizadas em produtos alimentícios *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium adolescentis* (FERREIRA, 2003).

Por outro lado, o gênero *Lactobacillus* compreende um grupo taxonômico heterogêneo de microrganismos, com 201 espécies atualmente conhecidas (BULL et al., 2014), sendo o maior e principal gênero no grupo das bactérias do ácido láctico (ANGELIS; GOBBETTI, 2011). São Gram-positivos, do tipo bastonetes, retos ou curvos ocorrendo isolados ou em cadeia, catalase negativa, microaerófilos, mesofílicos, não esporulados e produtores de ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015), motivo que justifica resistência desses microrganismos em ambientes mais ácidos.

O gênero foi estudado como probiótico pelo fato das evidências de seus benefícios para a saúde (FENG et al., 2015). Esse gênero ainda é classificado como homofermentativo ou heterofermentativo (FELIS; DELLAGIO, 2007), com base no produto final da sua fermentação. Os homofermentativos fermentam açúcares (glicose) por meio da via de *Embdem-Meyerhof* ou via glicolítica a ácido pirúvico e, este, sob a ação da enzima lactato desidrogenase produz ácido lático, sendo o principal produto da fermentação da glicose. Já os heterofermentativos degradam a glicose através da via oxidativa das pentoses fosfato, e além do ácido lático, formam outras substâncias, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono (MOZZI, 2016).

As espécies de *Lactobacillus* são consideradas seguras (GRAS – *generally recorgnized* as safe) pela *Food and Drug Administration* (Administração de alimentos e medicamentos - FDA), devido à sua extensa história de uso seguro e presença na microbiota intestinal de seres humanos (PISANO et al., 2014). E podem ser encontradas em vários habitats desde que sejam ricos em nutrientes como animais vertebrados e invertebrados e também em plantas, cereais, legumes, frutas, bebidas fermentadas, queijos e outros produtos lácteos, carnes e derivados (DUAR et al., 2017).

Diversos lactobacilos foram isolados do organismo humano. No trato gastrointestinal, existe uma grande variedade incluindo *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus reuteri e Lactobacillus plantarum* (MOAL; SERVIN, 2014), podendo ser encontrados também nas membranas das mucosas, cavidade oral, intestinal e vaginal (FELIS; DELLAGIO, 2007).

Em produtos probióticos à base de vegetais, as estirpes mais utilizadas são *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum e Bifidobacterium lactis* (MARTINS et al., 2013).

A grande maioria das estirpes bacterianas probióticas pertence ao grupo de bactérias lácticas e sua funcionalidade, de modo geral, depende da estirpe probiótica (KANMANI; LIM, 2013). No entanto, para Foligné, Daniel e Pot (2013), bactérias não láticas e leveduras com alegações probióticas também tem sido objeto de estudo. Dentre elas têm-se estirpes de *Bacillus, Clostridium, Propionibacterium* e bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*.

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum é um microrganismo Gram-positivo, catalase negativo, anaeróbio facultativo e não esporulado (DASH et al., 2014), heterofermentativo facultativo (SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIEG, 2011; ZHANG et al., 2016) e está, principalmente, associado a matrizes vegetais (HAMMES; HERTEL, 2006), estando presente em diversos tipos de alimentos fermentados como chucrute, grãos de cacau e makdoods (NOUT; SARKAR; BEUCHAT, 2007; MAHASNEH; MAHASNEH, 2017).

É uma espécie heterogênea e bastante versátil, encontrada em muitos nichos ecológicos, como produtos lácteos, cárneos e vegetais, no trato gastrointestinal de humanos e animais (KAUSHIK et al., 2009; SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIEG, 2011).

Apresenta boa aderência às paredes intestinais e exibe elevada resistência aos sucos gástricos e sais biliares (VRIES et al., 2006; WANG et al., 2010), o que permite sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal humano (VRIES et al., 2006).

Estudos já constataram que algumas estirpes melhoram a função de barreira intestinal e os sintomas da síndrome do intestino irritável, produzem bacteriocinas e ácidos orgânicos (SABO et al., 2014), exopolissacarídeos (WANG et al., 2015) e apresentam atividade lipolítica (ESTEBAN-TORRES et al., 2015).

L. plantarum está presente na lista dos produtos GRAS ("Geralmente reconhecido como seguro") (KANMANI et al.; 2013) e decorrente da sua contribuição para saúde intestinal houve um crescente interesse por essa espécie (SHEN et al., 2014).

2.2.2. *Lactobacillus rhamnosus*

Dentre os *Lactobacillus* considerados probióticos, *L. rhamnosus* é uma cultura heterofermentativa (PETRULÁKOVÁ; VALÍK, 2015), que vêm se destacando pelo seu grande potencial probiótico (MONTANARI, 2017). Segundo Doron, Snydman e Gorbach (2005), *L. rhamnosus* GG foi patenteado (US 4839281 A) e licenciado para Valio Ltda.

A estirpe possui temperatura ótima de crescimento de 35 °C a 40 °C, é tolerante a ácidos, sendo o pH ótimo entre 4,5 e 6,4, com taxa de crescimento constantemente reduzida quando o pH está entre 3,6 e 4,0. É um bastonete Gram-positivo curto, fino, agrupado em paliçada e catalase negativo (SHAH, 2007).

Uma característica da estirpe GG que tem gerado interesse por parte dos pesquisadores é sua elevada resistência ao suco gástrico e propriedades de adesão

(REUNANEN et al., 2012), colonizando o trato gastrointestinal após três dias de ingestão (PITINO et al., 2010). Estudos também relataram a robustez tecnológica desta estirpe e a presença de pili proteico, estrutura que era encontrada somente em patógenos Gram-positivos. A existência do pili atribui a esta estirpe maior adesão às células do hospedeiro explicando, assim, o seu maior tempo no intestino comparado aos lactobacilos que não apresentam essa estrutura (REUNANEM et al., 2012). Essas características conferem posição de destaque a essa estirpe.

São atribuídos à *L. rhamnosus* GG diversos benefícios à saúde como a melhoria da sensibilidade à insulina (KIM et al., 2013), alívio, prevenção e tratamento da diarreia, infecções infantis, alergias, dentre outros (FONG et al., 2015). A literatura relata que esta estirpe resiste ao passar pelo trato intestinal e possui a capacidade de permanecer por alguns dias na microbiota intestinal, sem que se tenha uma nova ingestão, característica importante para prevenção de algumas doenças intestinais (GOLDIN et al., 1992; KUMPU et al., 2013).

Estas características vêm se destacando entre os pesquisadores quanto ao seu uso na elaboração de produtos alimentícios probióticos de base não láctea, visto que a estirpe é reconhecida como GRAS ("Geralmente reconhecido como seguro") para consumo (RANDAZZO et al., 2013).

L. rhamnosus GG não apresenta bom crescimento em produtos de base láctea, em decorrência de não fermentar a lactose, diferenciando, assim, de outras estirpes de lactobacilos. Também produz pouca quantidade de ácido lático e grande quantidade de ácido acético, modificando o sabor desses produtos (GOLDIN et al., 1992).Entretanto, esta estirpe tem mostrado bom desempenho em produtos de origem vegetal e vem sendo bastante estudada por nosso grupo de pesquisa (MARTINS et al., 2013; FURTADO, 2017; MOREIRA et al., 2017; CAMPOS et al., 2019a; CAMPOS et al., 2019b).

Apesar de até o momento, estirpes de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG se desenvolverem satisfatoriamente em vegetais, existem espécies probióticas que quando adicionadas a frutas e hortaliças e seus produtos não resistem bem (KARASU; SIMSEK; CON, 2010; GALGANO et al., 2015), a exemplo de *L. acidophilus*. Esta bactéria probiótica cresce devagar (FERREIRA, 2008), restringindo o seu uso em algumas preparações alimentícias, apesar de exibir um grau satisfatório de tolerância aos sais biliares e sucos gástricos (ANUKAM; KOYAMA, 2007). Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa

mostram que *L. acidophilus* não é tão promissor quanto *L. plantarum e L. rhamnosus* em produtos de origem vegetal (FURTADO, 2017). Yoon, Woodams e Hang (2005) avaliaram *L. acidophilus, L. casei, L. plantarum e L. delbrueckii* em suco de beterraba e também consideraram que *L. acidophilus* foi menos estável no suco fermentado, com maior redução de viabilidade, comparado as demais culturas durante a estocagem refrigerada.

Komatsu, Buriti e Saad (2008) relataram que algumas estirpes de bactérias probióticas não conseguem resistir em produtos fermentados, portanto, é necessário considerar a escolha da estirpe mais apropriada para cada tipo de produto.

2.3. Produtos de origem vegetal contendo bactérias probióticas

Culturas probióticas são veiculadas tradicionalmente em produtos lácteos (GRANATO et al., 2018), porém existe um número crescente de indivíduos com intolerância e alergia aos derivados lácteos, hipercolesterolêmicos, vegetarianos, veganos? que necessitam de dietas com restrição de gordura e que não consomem produtos lácteos por questões de hábitos ou cultural (VASUDHA; MISHRA, 2013). De acordo com Zychar e Oliveira (2017), 70% da população mundial sofre de intolerância à lactose, o que justifica a busca por novas matrizes não lácteas como veículo de bactérias probióticas, a fim de atender essa parcela da população.

Os vegetais têm-se apresentado como alternativa para inserção dessas bactérias na dieta, visto que frutas e hortaliças possuem nutrientes que auxiliam o seu crescimento (MARTINS et al., 2013). Esses alimentos possuem micronutrientes e fibras, carboidratos, e são fontes de vitamina C, vitaminas do complexo B, pró-vitamina A, fitosteróis, minerais e fitoquímicos, que são essenciais à dieta e ao metabolismo microbiano (GEBBERS, 2007). Por isso, estes revelam um potencial para atuarem como veículo de probióticos em função de suas características intrínsecas (MARTINS et al., 2015) como, por exemplo, a presença de prebióticos naturais que promovem o crescimento e atuam como protetores de microrganismos probióticos durante a vida útil do produto e na passagem pelo trato gastrointestinal (MARTINS et al., 2013).

Estudos mostram que além dos alimentos a base de frutas e hortaliças serem carreadores de bactérias probióticas, estes apresentam boas características sensoriais (GALGANO et al., 2015). No entanto, a viabilidade de bactérias probióticas em matrizes

vegetais dependerá de alguns fatores como o tipo de vegetal utilizado, o pH, o teor de oxigênio do meio e também a estirpe empregada.

Matrizes a base de frutas, legumes e cereais vêm sendo estudadas como carreadoras de probióticos (Quadro 1) em geleias, sucos, minimamente processados, frutas e hortaliças fermentadas e não fermentadas, chucrutes, dentre outros (MARTINS et al., 2013).

Acredita-se que esses alimentos apresentem um futuro promissor (PERES et al., 2012; MARTINS et al., 2016), uma vez que se observa um grande empenho da indústria e dos pesquisadores em avaliar novas matrizes (FENG et al., 2015), a fim de expandir o mercado de produtos probióticos fermentados ou fortificados (ARGYRI et al., 2013).

2.3.1. Sucos

Estudos recentes sobre a utilização de microrganismos probióticos em sucos comerciais relatam o oferecimento de 6 a 9 Log de UFC de probióticos por porção. Entre as culturas usadas estão *L. plantarum, B. lactis* e *L. acidophilus* em sucos de mirtilo com açaí, suco de manga, de romã com amora preta, de morango, dentre outros (PERRICONE et al., 2015).

Costa et al. (2013) realizaram uma pesquisa com suco de abacaxi como substrato para a produção de uma bebida probiótica contendo *L. casei* NRRL B442. As condições ótimas encontradas foram temperatura de 31 ºC, pH 5,8 e o tempo de fermentação de 12 horas, sendo os sucos mantidos sob refrigeração por 42 dias para a realização das análises. A viabilidade da cultura no produto foi de 6,03 Log UFC/mL para o suco não adoçado e 4,77 Log UFC/mL para o suco adoçado, ao final da vida de prateleira do produto. O pH dos sucos diminuíram durante o tempo de estocagem, característica já esperada devido a produção de ácido lático. Os autores concluíram que este suco é um substrato adequado para *L. casei*, sendo uma bebida probiótica não láctea.

Suco de repolho probiótico foi desenvolvido por Jaiswal; Abu-Ghannam (2013) usando estirpes de bactérias láticas. Os autores investigaram o efeito das culturas sobre o teor de polifenóis e a capacidade antioxidante e verificaram aumento significativo, após 24 horas de fermentação, de *L. brevis, L. plantarum* e *L. rhamnosus* correspondente a 9,19; 9,47 e 10,6 Log UFC/mL, respectivamente, demonstrando o efeito promissor do produto.

Quadro 1 - Estudos sobre a utilização de matrizes vegetais como veículo de bactérias probióticas.

Matriz suporte	Probiótico utilizado	Produto alimentício	Referência
Azeitona	*L. plantarum*	Azeitona de mesa	Hurtado et al. (2012)
Malte e cevada	*L. plantarum* e *L. acidophilus*	Bebida	Rathore; Salmerón; Pandiella (2012)
Cenoura	*L. acidophilus, Bifidobacterium lactis, L. rhamnosus* e *L. plantarum*	Suco	Daneshi et al. (2013)
Repolho	*L. brevis, L. plantarum* e *L. rhamnosus*	Suco	Jaiswal e Abu-Ghannam (2013)
Pessêgo	*L. rhamnosus*	Geleia	Randazzo et al. (2013)
Suco de abacaxi e soro	*L. acidophilus*	Bebida	Shukla, Jha e Admassu (2013)
Couve	*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*	Minimamente processado	Silva et al. (2013)
Açaí	*L. acidophilus* La-5 e *Bifidubacterium animalis*	Sobremesa	Vasconcelos et al. (2014)
Repolho	*Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*	Chucrute	Xiong et al. (2014)
Azeitona	*L. plantarum*	Pasta	Alves et al. (2015)
Leguminosas (soja, grão de bico, feijão, lentilha, ervilha)	*L. rhamnosus* GG	Mingau	Petrulàkovà e Valìk (2015)
Cenoura	*Lactobacillus spp*	Purê	Juvonen et al. (2015)
Tomate	*L. acidophilus, L. plantarum* e *L. casei*	Suco	Kaur, kaur e Grover (2016)
Cereja	*L. casei*	Suco	Nematollahi et al. (2016)
Pepino	*L. casei, L. rhamnosus, L. acidophilus, L. plantarum* e *L. peniusus*	Picles	Fan et al. (2017)
Água de coco	*L. plantarum* DW12	Bebida fermentada	Kantachote et al. (2017)
Berinjela, nozes, alho, pimenta e azeite	*Lactobacillus spp*	Makdoos	Mahasneh e Mahasneh (2017)
Figo	*L. fermentum*	Suco	Panda et al. (2017)
Morango e farinha de yacon	*L. acidophilus*	Sorvete	Parussolo et al. (2017)
Cacau	*L. paracasei e L. acidophilus*	Chocolate branco	Konar et al. (2018)
Mirtilo	*Bacillus amyloliquefaciens* e *Lactobacillus brevis*	Extrato de Mirtilo fermentado	Jeong et al. (2018)

Fonte: dos autores

Pimentel et al. (2015) estudaram a suplementação de suco de maçã com *L. paracasei* ssp e/ou oligofrutose durante armazenamento refrigerado em embalagens plásticas ou de vidro. A suplementação com oligofrutose aumentou a resistência do probiótico durante o armazenamento e a embalagem de vidro foi mais apropriada que a de plástico na manutenção da viabilidade da cultura.

Campos et al. (2019a) analisaram a resistência de *L. rhamnosus* GG às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* em suco de abacaxi com juçara bem como os efeitos da ingestão do suco no tratamento de lesões pré-neoplásicas em ratos *Wistar*. A autora verificou que o suco pode ser considerado um ótimo veículo do probiótico, uma vez que este se manteve viável durante a vida de prateleira com contagens acima de 9,2 Log de UFC por porção de 100 mL. O suco não exerceu efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas nos ratos, porém pode ser consumido a fim de prevenir doenças coronarianas por contribuir na redução da fração LDL do colesterol.

Já Pires (2016) avaliou a mesma bebida mista probiótica de abacaxi com juçara desenvolvida por Campos et al. (2019a) frente à resistência ao trato gastrointestinal humano. O autor constatou que este alimento apresenta apelo funcional, uma vez que *L. rhamnosus* GG apresentou, após 28 dias de consumo, contagem média de 7,1 Log UFC/g nas fezes dos indivíduos e após 42 dias de interrupção do consumo, a contagem era de 4,1 Log UFC/g.

Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa desenvolveu suco misto de juçara e manga Ubá, contendo *L. rhamnosus* GG, utilizando pasteurização e alta pressão isostática (MOREIRA et al., 2017). A equipe constatou que os sucos utilizando processamento por alta pressão isostática (API) ou pasteurização foram considerados carreadores do probiótico e apresentou contagem acima de 8,0 UFC/ mL.

Furtado (2017) avaliou a viabilidade de *L. acidophilus* La-05, *L. plantarum* LP299v e *L. rhamnosus* GG em suco tropical de manga após ensaio *in vitro* de resistência gastrointestinal. Os autores constataram que em todos os tempos de análise, a quantidade de células viáveis que alcançariam o intestino grosso em uma porção mínima de 100 mL dos sucos tropicais seria de 3,06, 6,98 e 7,88 Log UFC/ mL para *L. acidophillus* La-05, *L. rhamnosus* GG e *L. plantarum* LP299v, respectivamente. O suco tropical de manga não se mostrou uma boa matriz para veicular *L. acidophillus* La-05,

porém *L. rhamnosus* GG e *L. plantarum* LP299v apresentaram quantidade suficiente para promover benefícios ao hospedeiro.

Bebida mista de leguminosas (soja e amendoim), goiaba e beterraba adicionada de *L. rhamnosus* GG foi desenvolvida por Montanari (2017). Após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, os autores observaram que a cultura probiótica se manteve viável durante a vida de prateleira das bebidas mistas de soja e amendoim com contagens acima de 8,8 Log de UFC/mL e 9,5 Log de UFC/mL, respectivamente. Portanto, o mix soja ou amendoim, beterraba e goiaba apresentou-se como um excelente carreador de *L. rhamnosus* GG.

Além dos sucos não fermentados, bebidas fermentadas são muito conhecidas no mundo e são promotoras de saúde. Desta forma, grande esforço tem sido feito para desenvolver bebidas fermentadas probióticas apresentando extrato hidrossolúvel de soja, soro de leite, cereais, sucos de frutas e legumes, com intuito de contribuir de forma enriquecedora como parte significativa do mercado de alimentos funcionais (MARSH et al., 2014).

2.3.2. Produtos minimamente processados

Os produtos minimamente processados são alimentos saudáveis e comercializados nos grandes centros urbanos brasileiros. São definidos como frutas ou hortaliças, ou a combinação destas, que passaram por alterações físicas, mas apresentam características semelhantes ao produto na forma natural.

Silva et al. (2013) avaliaram a viabilidade de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* em couve minimamente processada, além das características físico-químicas e microbiológicas do produto. As amostras estavam de acordo com os padrões brasileiros para *Salmonella sp.* e coliformes a 45 °C e os microrganismos probióticos apresentaram-se viáveis no produto com contagens de, aproximadamente, 10^7 UFC/g, comprovando que a couve minimamente processada pode ser veículo para esses microrganismos.

Revestimento comestível à base de pectina de baixa metoxilação foi desenvolvido por Rodrigues (2017) para veicular microrganismo probiótico em cenoura e goiaba minimamente processada. Foram utilizados no revestimento à base de pectina: *L. acidophilus* LA3, *L. plantarum* CH6072 e L286, *L. paracasei* BGP1, *L. acidophilus* LA3 em combinação com *L. plantarum* CH6072 e L286, *L. acidophilus* LA3 em combinação com *L.*

paracasei BGP1 e *L. plantarum* CH6072 e L286 em combinação com *L. paracasei* BGP1. As bactérias mostraram-se viáveis quando os revestimentos comestíveis foram incorporados à cenoura e goiaba minimamente processadas.

Estudo realizado por Russo et al. (2015) avaliou melões minimamente processados como matriz alternativa de veiculação de *L. plantarum* B2 e *L. fermentum* PBCC11.5 durante 11 dias de armazenamento refrigerado. Os probióticos também foram testados contra *Listeria monocytogenes* na fruta. As duas estirpes alcançaram o final da vida útil com elevada viabilidade e os atributos sensoriais de odor e sabor foram significativamente afetados quando inoculados com *L. plantarum* B2. As duas estirpes probióticas reduziram as contagens de *L. monocytogenes* nos melões contaminados, indicando seu efeito bioprotetor.

Salada de frutas contendo *L. rhamnosus* HN001 foi estudada por Martins et al. (2016). Os autores verificaram que após cinco dias de estocagem refrigerada o produto continha 8,49 Log UFC/g de *L. rhamnosus*, sendo bem aceito pelos consumidores.

Iglesias et al. (2018) avaliaram a capacidade antagônica de *L. rhamnosus* GG em 5 espécies de Salmonella e de *L. monocytogenes* em pera minimamente processada. A contagem de *L. monocytogenes* foi reduzida em, aproximadamente, 1,8 Log quando a pera foi inoculada com *L. rhamnosus* GG, porém nenhum efeito foi observado sobre *Salmonella* sp. A qualidade da fruta não foi afetada quando o probiótico foi inoculado, sendo este capaz de controlar a população de *L. monocytogenes* no produto.

Os benefícios nutricionais de bactérias láticas probióticas contribuem para aumentar o consumo de vegetais minimamente processados enriquecidos com estes microrganismos, uma vez que o consumidor moderno busca produtos de alta funcionalidade e segurança.

2.3.3. Cereais e sementes

Os cereais são apontados como fonte de nutrientes, compreendendo vitaminas, proteínas, fibras alimentares e minerais, entre outros (TODOROV; HOLZAPFEL, 2015). Diversas tecnologias são utilizadas para transformar cereais em alimentos, porém a fermentação representa a melhor forma para melhorar os atributos sensoriais e sua vida de prateleira (KOHAJDOVÁ, 2017).

Novos produtos alimentícios contendo sementes e cereais têm sido elaborados e pesquisados como carreadores de probióticos em alternativa aos lácteos (SALMERÓN; THOMAS; PANDIELLA, 2015; CHAVAN et al., 2018; MENEZES et al., 2018).

Rathore, Salmerón e Pandiella (2012) analisaram uma bebida probiótica de malte, cevada e a mistura de malte e cevada contendo *L. plantarum* NCIMB 8826 e *L. acidophilus* NCIMB 8821. Os autores estudaram o efeito do malte, cevada e sua mistura durante a fermentação por 28 horas a 30 ºC e concluíram que houve melhor crescimento das culturas probióticas na bebida contendo malte, em que se obteve 8,59 Log UFC/mL de *L. plantarum* e 8,69 Log UFC/mL de *L. acidophilus*.

Os atributos de qualidade de uma salada elaborada com cereais e culturas probióticas foram estudados por Gautam e Sharma (2014). O produto foi preparado após a fermentação de cereais mistos (*Triticum aestivum L., Linum usitatissimun L.*) e sementes de chia (*S. hispanica L.*) contendo as bactérias láticas *L. brevis* e *L. spicheri* G2. Não ocorreu perda de viabilidade das culturas e não se observou deterioração do produto durante a estocagem refrigerada a 5 ºC.

Gupta e Bajaj (2017) desenvolveram uma bebida com farinha de aveia e mel fermentada com *L. plantarum* M-13. Foram testadas algumas concentrações de farinha de aveia, tempo de incubação da cultura probiótica e teor de mel usado e as melhores condições que promoveram a contagem do probiótico foram: 8,0% m/v de farinha de aveia, 48 horas de incubação e 3,0% m/v de mel. Nestas condições, o produto apresentou excelente viabilidade do probiótico com contagem de até 16,9 Log UFC/mL, durante um período de três semanas de armazenamento à temperatura ambiente e refrigerada.

Mucilagem e proteína solúvel extraídas de semente de chia (*Salvia hispanica L.*) e linhaça (*Linum usitatissimum L.*) foram usadas por Bustamante et al. (2017) como material de encapsulamento de *L. plantarum* e *Bifidobacterium infantis* por *spray drying* em suco em pó instantâneo. A viabilidade após encapsulamento nas misturas de maltodextrina combinada com mucilagem e proteína solúvel extraída das sementes foi >98% e o mix protegeu as culturas, aumentando sua resistência ao suco gástrico e aos sais biliares. Os probióticos encapsulados com as misturas incorporadas no suco em pó exibiram alta viabilidade (>9 Log UFC/g) após 45 dias de armazenamento refrigerado. Portanto, os autores concluíram que as sementes de chia e linhaça são excelentes substratos para o encapsulamento de probióticos.

2.3.4. Hortaliças cruas e fermentadas, molhos e antepastos

As hortaliças cruas e fermentadas também têm sido objetos de pesquisa como veiculadoras de culturas probióticas por possuirem várias bactérias do ácido lático, como *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* e *L. mesenteroides* como parte de sua microbiota natural (SWAIN et al., 2014). Estes microrganismos são, muitas vezes, isolados de processos de fermentações artesanais incluindo alcaparras, cenouras, couve-flor, pepino, berinjela, pimentões, alho, repolho e várias misturas de vegetais (Quadro 2).

Os vegetais crus e fermentados representam excelentes veículos para bactérias probióticas devido à suas estruturas naturais que permitem fácil disponibilidade de nutrientes para o crescimento microbiano (SOCCOL et al., 2010; PERES et al., 2012). Os tecidos vegetais são constituídos de espaços intracelulares, poros e capilares, além de fissuras e lesões de superfície, podendo os microrganismos penetrar nesses tecidos (BRACKETT; SPLITTSTOESSER, 2001). O descascamento e o corte realizados durante o processamento podem também beneficiar a disponibilidade de nutrientes, como açúcares, vitaminas e minerais indispensáveis para o crescimento do probiótico (RÖßLE et al., 2010; SOCCOL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Diversos processos de fermentação são empregados na fabricação de alimentos e, entre eles, a fermentação por bactérias lácticas (LAB) é bastante comum e ocasiona mudanças no perfil e nos tipos de compostos bioativos. Moléculas como peptídeos bioativos, ácidos graxos de cadeia curta ou polissacarídeos são produzidos, ao passo que o teor de açúcar ou de compostos anti-nutricionais são reduzidos e compostos fenólicos são convertidos em moléculas com valor biológico. Essas transformações, associadas ao suprimento de prebióticos e/ou probióticos, assim como à melhoria da biodisponibilidade dos componentes dos alimentos, resultam em alterações das propriedades referentes à saúde (MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2017).

Quadro 2 - Bactérias do ácido lático isoladas e/ou presentes em produtos vegetais fermentados consumidos mundialmente.

Matriz	Bactérias láticas isoladas e/ou presente	Produto	Referência
Berinjela	*L. plantarum, L. brevis e L. fermentum*	-	Sesena et al. (2001)
Cenoura, feijão e abobrinha	*L. plantarum, L. Fermentum*	-	Di Cagno et al. (2008)
Abóbora d'água, açúcar, sal e soja	*W. paramesenteroides* e *W. cibaria*	*Yan-dong-gua*	Lan; Chen; Yanagida (2009)
Repolho e diversos outros vegetais	*L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. rhamnosus*	*Sauerkraut*	Yang et al. (2010)
Repolho, rabanete, mostarda e couve-flor	*Pediococcus* e *Lactobacillus* spp	*Gundruk*	Tamang (2011)
Repolho, aipo, pepino e rabanete	*L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. lactis* e *L. fermentum*	*Paocai*	Feng et al. (2012)
Azeitona	*L. plantarum* e *L. Rhamnosus*	-	Argyri et al. (2013)
Brocólis	*L. plantarum*	*Yan-tsai-shin*	Chen et al. (2013)
Azeitona	*L pentosus, L. plantarum e L paraplantarum,*	Azeitona de mesa	Gallego et al. (2013)
Repolho	*L. plantarum* e *L. Rhamnosus*	*Kimchi*	Ji et al. (2013)
Pimenta doce, abóbora e tomate	*L. plantarum, L. brevis* e *Pediococcus pentosaceus*	-	Jozwiak et al. (2013)
Mostarda e beterraba	*L.* fermentum	*Dua Muoi*	Nguyen et al. (2013)
Berinjela	*L. pentosus*	*Ca Muoi*	Nguyen et al. (2013)
Repolho	*L. plantarum*	Chucrute	Beganovi´c et al. (2014)
Pepino	*L. plantarum*	-	Wakil; Laba; Fasiku (2014)
Repolho	*L. plantarum e L. Brevis*	*Suan-tsai*	Guo et al. (2015)
Alcaparra	*L. plantarum*	-	Palomino et al. (2015)
Repolho, alho, pimenta, cebola, gengibre e rabanete	*Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*	Kimchi	Nam; Ahn (2016)
Mostarda e tamarindo	*L. plantarum, L. fermentum* e *L. casei*	*Kahudi*	Goswami et al. (2017)
Mostarda e repolho	*L. mesenteroides*, *L. confuses*, *L. plantarum* e *P. pentosaceus*	*Sayurasin*	Panghal et al. (2018)

Fonte: dos autores
(-) não informado.

Vegetais fermentados são recomendados por médicos e nutricionistas devido às suas propriedades de saúde, tornando-se cada vez mais populares em muitos países, mesmo nos mais desenvolvidos em que esse tipo de alimento foi muitas vezes subestimado. Seu consumo é indicado uma vez que são alimentos de baixa caloria, apresentando quantidade de açúcares menores comparado com vegetais crus (JÓZWIAK et al., 2013). Além disso, são fontes de fibra dietética que impede a assimilação de gorduras e regula o peristaltismo intestinal. São também fontes de vitaminas C e vitaminas do complexo B, fenólicos e outros nutrientes (YOON; WOODAMS; HANG, 2005).

Pasta de azeitona como veículo da bactéria probiótica *L. plantarum* 33 foi estudada por Alves et al. (2015). A cultura foi incorporada ao produto na forma livre e encapsulada para avaliação da eficácia da microencapsulação sobre a resistência do probiótico. Propriedades sensoriais da pasta de azeitona durante a estocagem refrigerada foram avaliadas. Os autores concluíram que as células livres ou encapsuladas não interferiram na propriedade sensorial da pasta de azeitona, que demonstrou ser uma boa opção para incorporação de células livres de *L. plantarum*, uma vez que a microencapsulação influenciou significativamente a viabilidade durante a estocagem.

Argyri, Panagou e Tassou (2016) avaliaram azeitonas em conserva como carreadoras de bactérias probióticas e verificaram que as estirpes isoladas das azeitonas *in natura* tiveram mais chance de resistir no produto, devido à seleção natural.

Mosso, Lobo e Sammán (2016) desenvolveram um produto probiótico chamado de "queijo de batata" utilizando três tubérculos andinos como substratos para fermentação de *L. brevis* CJ25. O produto apresentou viabilidade de 8 Log UFC/g e pH 5,1. Mesmo após 28 dias de armazenamento refrigerado, o produto apresentou aumento na contagem de células viáveis e o valor de pH diminuiu. No ensaio *in vitro*, *L. brevis* demonstrou elevado nível de resistência ao suco gástrico durante 3 horas em pH 2,5 e resistência aos sais biliares após 3 horas de exposição, o que torna o produto um novo alimento funcional promissor.

Vegetais em conserva tipo *Chutney* e antepastos compostos de frutas, hortaliças e especiarias vêm sendo consumido como aperitivos pelos brasileiros que apreciam gastronomia e molhos *gourmet*. Estes apresentam sabor picante, agridoce e são muito consumidas no acompanhamento de carnes frias e assadas, grelhadas e *fondues*

(RIBEIRO et al., 2013). O consumo de molhos e conservas do tipo *chutney* é elevado entre os povos asiáticos que apreciam antepastos de frutas e hortaliças mistas em óleo vegetal.

Na legislação brasileira, os antepastos podem ser inseridos na Resolução RDC nº 352 (BRASIL, 2002) que define frutas e hortaliças em conserva, como o produto preparado com frutas frescas, congeladas ou previamente conservadas, inteiras ou em pedaços ou em forma de polpa, envasadas praticamente cruas ou pré-cozidas e tubérculos, raízes, rizomas, bulbos, talos, brotos, folhas, inflorescências, pecíolos, frutos, sementes e cogumelos cultivados, cujas partes comestíveis são envasadas praticamente cruas, reidratadas ou pré-cozidas, imersas ou não em líquido de cobertura apropriado, submetidas a processamento tecnológico antes ou depois de fechadas hermeticamente nos recipientes utilizados a fim de evitar sua alteração.

Conservas à base de frutas e hortaliças fermentadas com bactérias láticas probióticas estão presentes na alimentação de muitos povos, diferente do que se verifica no Brasil. Estudos revelam que na Jordânia, vegetais fermentados em salmoura como, por exemplo, *Makdoos*, são muito consumidos. Este produto pode ser processado de várias formas, mas tradionalmente é constituido de berinjela recheada com nozes moída, alho e pimenta, sendo deixado fermentar em óleo vegetal (azeite). A fermentação é iniciada com os microrganismos presentes nos vegetais e no recheio utilizado, mas as bactérias do ácido lático, principalmente *Lactobacillus* spp. são as maiores responsáveis pela fermentação (MAHASNEH; MAHASNEH, 2017).

Çetin (2011) avaliou o comportamento de *L. plantarum* em Turşu, um produto fermentado consumido na Turquia, contendo repolho, pepino, tomate verde, pimentão verde, cenoura, pimentão vermelho, alho e salsa durante 60 dias de armazenamento. O autor verificou que o produto apresentou viabilidade de *L. plantarum* igual a 7,49 Log UFC/mL no final da estocagem e que a adição de *L. plantarum* em Turşu realçou o sabor do produto.

A capacidade de estipes potencialmente probióticas de *L. plantarum* e *L. paracasei* resistirem em conservas de alcachofra durante 90 dias foi avaliada por Valerio et al. (2006). Os autores constataram que a fixação das estirpes bacterianas às alcachofras melhorou sua resistência à digestão gastrointestinal *in vitro*.

Recentemente, conservas de frutas e hortaliças fermentadas têm sido muito apreciadas pelos consumidores. Nesse sentido, Joshi, Somesh e Neerja (2011) prepararam e avaliaram aperitivos de vegetais contendo cenoura, rabanete e pepino com polpas de pera e manga fermentados com *L. plantarum* NCDC 020, *Pediococcus cerevisiae* NCDC 038 e *Streptococcus lactis* var. *diacetylactis* NCDC 061 e observaram que os produtos foram bem aceitos pelos consumidores, o que demonstra o seu potencial de mercado.

Acredita-se que os antepastos de vegetais podem ser mais uma opção de produto carreador de bactérias probióticas acessível à população que busca alimentos práticos, saborosos, saudáveis e que apreciam produtos *gourmet*.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O consumo de vegetais fermentados contendo bactérias probióticas vem aumentando entre os consumidores em função das tendências gastronômicas e de mercado, que faz com que o público opte por alimentos de fermentação natural no dia a dia em função do apelo saudável e funcional. Assim, produtos como antepastos, molhos e pastas estão sendo considerados uma nova opção de produto não lácteo, com potencial tecnológico para a indústria de conservas, sendo acessível a população que busca alimentos saborosos e diferenciados.

4. REFERÊNCIAS

ALVES, M.; PERES, C. M.; MENDONZA, A. H.; BRONZE, M. R.; PERES, C.; MALCATA, F. C. Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33. **Food Research International**, v. 75, p. 61-70, 2015.

ANGELIS, M de.; GOBBETTI, M. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp: General Characteristics. **Encyclopedia of Dairy Sciences,** 2.ed. p.78-90, 2011.

ANUKAM, K, C.; KOYAMA,T. Bile and Acid Tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A Potencial Probiotical Agent. **Academic Journals Inc**, v.2, p.275-280, 2007.

ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K. G.; TSAKA-LIDOU, E.; NYCHAS, G. J.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v.33, p. 282-291, 2013.

ARGYRI, A. A.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU. C, C. Probiotics from the Olive Microbiota. **Bioactive Foods in Health Promotion**, p. 371-389, 2016.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Influence of sub lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. **Food Microbiology**, v. 52, p. 77-83, 2015.

BEGANOVI´C, J.; BLAˇZENKA, K.; PAVUNC, A. L.; UROI´C, K.; JOKI ´C, M.; SUˇSKOVI´C, J. Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. **Microbiological Research**, v. 169, p. 623 - 632, 2014.

BUSTAMANTE, M.; B. OOMAH, D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry,** v.216, p.97-105, 2017.

BLANA, V. A.; GROUNTA, A.; TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E.; PANAGOU, E. Z. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. **Food Microbiology**, v.38, p. 208-218, 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 352, de 23 de dezembro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Frutas e ou Hortaliças em Conserva e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Frutas e ou Hortaliças em Conserva. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2003.

BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. Fruits and vegetables. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, DC: American Public Health Association, p. 515–520, 2001.

BULL, M. J.; JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; AERTS, M.; VANDAMME, P.; MAIDEN, M. C. J.; MARCHESI, J. R.; MAHENTHIRALINGAM, E. The domestication of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-8, 2014.

CAMPOS, R. C. D. A. B.; MARTINS, E. M. F.; DE ANDRADE PIRES, B.; PELUZIO, M. D. C. G.; DA ROCHA CAMPOS, A. N.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus L.* Merril) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food research international**, v. 116, p. 1247-1257, 2019a.

CAMPOS, P. A.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L.; MARTINS, A. D. O.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; SILVA, R. R.; TREVIZANO, L. M. *In vitro* resistance of *Lactobacillus plantarum* LP299v or *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by vegetable appetizer. **LWT Food Science and Technology**, v. 116, 2019b.

ÇETIN, B. Production of probiotic mixed pickles (Turşu) and microbiological properties. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.14926–14931, 2011.

CHAUHAN, S. V.; CHORAWALA, M. R. Probiotics, prebiotcs and sinbiotics. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 3, p. 711-726, 2012.

CHAVAN, M.; GAT, Y.; HARMALKAR, M.; WAGHMARE, R. Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. **Food Science and Technology**, v.91, p.339-344, 2018.

CHEN, Y. S.; LIOU, M. S.; JI, S. H.; YU, C. R.; PAN, S. F.; YANAGIDA, F. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems), a traditional fermented food in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p.125–132, 2013.

CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; PETRUZZI, L.; CASANOVA, F. P.; SINIGAGLIA, M. Functional beverages: The emerging side of functional foods commercial trends, research, and health implications. **Compreensive Review in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1192-1206, 2014.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; TIBÉRIO DE JESUS, A. L.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry,** v. 139, p. 261-266, 2013.

DAMODHARAN, K.; PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; SUH, J. W. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented radish and their anti-adherence activity against enteric pathogens. **Journal of Microbiology**, p. 1 – 43, 2015

DANESHI, M.; EHSANI, M. R.; RAZAVI, S. H.; LABBAFI, M. Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.16, p.1-12, 2013.

DASH, G.; RAMAN, R. P.; PRASAD, K. P.; MAKESH, M.; PRADEEP, M. A.; SEM, S. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Aquaculture**, v. 432, p. 225-236, 2014.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9-17, 2014.

DI CAGNO, R.; SURICO, R. F.; SIRAGUSA, S.; DE ANGELIS, M.; PARADISO, A.; MINERVINI, F.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, french beans or marrows**. International Journal of Food Microbiology**, v.127, p. 220-228, 2008.

DORON, S., SNYDMAN, D. R., GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and

Clinical Applications. **Gastroenterology clinics of north américa**, v. 34, p. 483–498, 2005.

DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PEREZMUÑOZ, M. E.; LEULIER, F.; GANZLE, M.; WALTER, J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 27-48, 2017.

EMSER, K.; BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P.; MORAIS, A. M. M. B. de. *Lactobacillus plantarum* survival during the osmotic dehydration and storage of probiotic cut apple. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 519-528, 2017.

ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHEÑO, J. M.; RIVAS, B. de LAS.; MUÑOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 246-252, 2015.

EVANS, M.; ZAKARIA, N.; GUTHRIE, N. More than a gut feeling: the regulations on using probiotics to build a better microbiome. **International Probiotics Association**, Zurich, Suiça, 2016. 19 p.

FAN, S.; BREIDT, F.; PRICE, R.; DÍAZ, I. P. Survival and Growth of Probiotic Lactic Acid Bacteria in Refrigerated Pickle Products. **Journal of Food Science**, v.82, p.167-173, 2017.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.8, p.44-61, 2007.

FERRANDO, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.; SUÁREZ, V. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A study *in vitro* of heat stress influence. **Food Microbiology**, v. 54, p. 154 -161, 2016.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas - Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. **In: Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção.** Viçosa: UFV, 2003. p. 07–33.

FERREIRA, C. L. L. F. Microrganismos probióticos e de ação probiótica. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 17, n. 103, 2008.

FENG, J.; LIU, P.; YANG, X.; ZHAO, X. Screening of immunomodulatory and adhesive *Lactobacillus* with antagonistic activities against Salmonella from fermented vegetables. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v.31, p.1947-1954, 2015.

FENG, M.; CHEN, X.; LI, C.; NURGUL, R.; DONG, M. Isolation and Identification of an Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strain from Chinese Paocai and Biosorption of Pb(II) by Its Exopolysaccharide. **Journal of Food Science**, v.77, p. 111-117, 2012.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 284-292, 2013.

FONG, F. L. Y.; KIRJAVAINEN, P.; WONG, V. H. Y.; NEZAMI, H, E. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donos. **Journal of Functional Foods,** v.13, p.71-79, 2015.

FURTADO, L. L. **Viabilidade de bactérias probióticas em suco tropical de manga e sobrevivencia das estirpes às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.** 64f. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG.

GALLEGO, J. B.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; FERNÁNDEZ, A. G .; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, p. 135-142, 2013.

GALGANO, F.; CONDELLI, N.; CARUSO, M. C.; COLANGELO, M. A.; FAVATI, F. Probiotics and Prebiotics in Fruits and Vegetables: Technological and Sensory Aspects. *In*: RAI, V. R.; BAI, J. A. (eds.). **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**. Boca Raton, London: CRC Press, 2015. chapter 10, p. 189-206.

GAUTAM, N.; SHARMA, N. Quality atributes of a novel cereal based probiotic product prepared by using food grade lactic acid bactéria. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v.13, p.525-530, 2014.

GEBBERS, J. O. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition and statins – a critical review. **German Medical Science**, v. 5, p.1-11, 2007.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEM, S. Survival of *Lactobacillus* species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 98-107, 2015.

GOSWAMI, G.; BORA, S. S.; PARVEEN, A.; BORO, R. C.; BAROOAH, M. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated from Kahudi, a traditional

rapeseed fermented food product of Assam, India. **Journal of Ethnic Foods**, v.4, p. 187-197, 2017.

GRANATO, D.; NAZZARO, F.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; CRUZ, A. G. DA. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. **Reference Module in Food Science**, p. 1-7, 2018.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. Microbiota of the Intestine: Probiotics. **Encyclopedia of Human Nutrition,** Academic press, 3. ed., p.175-181, 2013.

GUO, C. F.; ZHANG, S.; YUAN, Y. H.; YUE, T. L.; LI, J.Y. Comparison of *lactobacilli* isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 294-302, 2015.

GUPTA, M.; BAJAJ, B. K. Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle. **Food Bioscience**, v. 20, p. 104-109, 2017.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *In*: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (ed.). **The prokaryotes.** Springer, New York, 2006. p. 320–403.

HURTADO, A.; REGUANT, C.; BORDONS, A.; ROZÉS, N. Lactic acid bactéria from fermented table olives. **Food Microbiology**, v. 31, p. 1-8, 2012.

IGLESIAS, M. B.; ECHEVERRÍA, G.; VIÑAS, I.; LÓPEZ, M. L.; ABADIAS, M. Biopreservation of fresh-cut pear using *Lactobacillus rhamnosus* GG and effect on quality and volatile compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 581-588, 2018.

JAISWAL, A. K.; ABU-GHANNAM, N. Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. **Industrial Crops and Products,** v. 50, p. 212-218, 2013.

JEONG, S. Y.; VELMURUGAN, P.; LIM, J. M.; OH, B. T.; JEONG, D. Y. Photobiological (LED light)-mediated fermentation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit with probiotic bacteria to yield bioactive compounds. **Food Science and Technology**, v. 93, p. 158 – 166, 2018.

JI, Y.; KIM, H.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, H.; SHIN, H.; KIM, B.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. **Food Control**, v. 31, p. 467 – 473, 2013.

JOSHI, V.; SOMESH, S.; NEERJA, R. Preparation and evaluation of appetizers from latic acid fermented vegetable. **Journal of Hill Agriculture**, v.2, p. 20-27, 2011.

JÓZWIAK, K. P.; ROZMIERSKA, J.; CHABLOWSKA, B.; STECKA, K. M.; SKQPSKA, S.; KLISZCZ, M.; RZESZOWIAK, E. S. Starter Cultures for Lactic Acid Fermentation of Sweet Pepper, Pattypan Squash and Tomatoes. **Food Technology**, v.63, p.95-102, 2013.

JUVONEN, R.; HONKAPÄÄ, K.; MAINA, N. H.; SHI, Q.; VILJANEN, K.; MAAHEIMO, H.; VIRKKI, L.; TENKANEN, M.; LANTTO, R. The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology,** v. 207, p. 109-118, 2015.

KANMANI, P.; SATISH KUMAR, R.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Probiotics and its functionally valuable products – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 641–658, 2013.

KANMANI, P.; LIM, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1041–1049, 2013.

KANTACHOTE, D.; RATANABUREE, A.; HAYISAMA, W.; SUKHOOM, A.; NUNKAEW, T. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. **Journal of Functional Foods**, v.32, p. 401-408, 2017.

KARASU, N.; SIMSEK, O; CON, A. H. Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. **Annals of Microbiology** ,v.2, p. 227–234, 2010.

KAUR, S.; KAUR, H. P.; GROVER, J. Fermentation of Tomato juice by Probiotic Lactic acid bactéria. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 2, p. 212-219, 2016.

KAUR, N.; SINGH, D. P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167- 187, 2017.

KAUSHIK, J. K.; KUMAR, A.; DUARY, R. K.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. **Plos One**, v. 4, p. 1-11, 2009.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H. S.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, p. 1-13, 2018.

KIM, S. W.; PARK, K. Y.; KIM, B.; KIM, E.; KEE, C. H. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.431, p. 258-263, 2013.

KOHAJDOVÁ, Z. Fermented Cereal Products. *In*: PANDEY, A.; SANROMÁN, M. Á.; DU, G.; SOCCOL, C.R.; DUSSAP, C.G. (ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry**. Chapter 4, 2017. p. 91-117.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p.329-347, 2008.

KONAR, N.; PALABIYIK, I.; TOKER, O. S.; POLAT, D. G.; KELLECI, E.; PIROUZIAN, H. R.; AKCICEK, A.; SAGDIC, O. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 206-213, 2018.

KUMPU, M.; SWASNLJUNG, E.; TYNKKYNEN, S.; HATAKKA, K.; KEKKONEN, R. A., JARVENPAA, S.; KORPELA, R.; PITKARANTA, A. Recovery of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in tossil tissue after oral administration: randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v.109, p. 2240-2246, 2013.

LAN, W. L.; CHEN, Y. S.; YANAGIDA, F. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-dong-gua (fermented wax gourd), a traditional fermented food in Taiwan. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, p. 484-487, 2009.

LUGLI, G. A.; MILANI, C.; TURRONI, F.; DURANTI, S.; FERRARIO, C.; VIAPPIANI, A.; MANCABELLI, L.; MANGIFESTA,M.; TAMINIAU, B.; DELCENSERI, V.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. **Appl. Environ. Microbiol**, v.20, p. 6383–6394, 2014.

MAHASNEH, A. M.; MAHASNEH, S. A. Probiotic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Local Fermented Vegetables (*Makdoos*). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, p. 1673-1686, 2017.

MALATERRE, A. S.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, p.1-14, 2017.

MARINO, M.; INNOCENTE, N.; CALLIGARIS, S.; MAIFRENI, M.; MARANGONE, A.; NICOLI, M. C. Viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in structured emulsions containing saturated monoglycerides. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 51-59, 2017.

MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D**.** Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v.38, p.113-124, 2014.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bactéria. **Food Research International**, v.51, p.764-700, 2013.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; RODRIGUES, M. Z. Research and development of probiotic products from vegetable bases: A New Alternative for Consuming

Functional Food. *In*: RAI, V. R.; BAI, J. A. (ed.). **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**. Boca Raton, London: CRC Press, 2015. p. 207-223.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. **Food Science and Technology,** v. 36, n. 3, p. 540-548, 2016.

MENEZES, A. G. T.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187 – 197, 2018.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J. ; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – An international consensus. **Food & Function**, p. 1113 - 1124, 2014.

MOAL, V. L. L.; SERVIN, A. L. Anti-infective activities of *lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 167-199, 2014.

MONTANARI, S. R. **Bebida mista de leguminosas, goiaba e beterraba adicionada de *lactobacillus rhamnosus* GG: avaliação físico-química, microbiológica, sensorial e de sobrevivência da estirpe às condições gastrointestinais simuladas *in vitro.*** 2017.80f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG.

MOREIRA, R. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; CRISTIANINI, M.; CAMPOS, A. N. R.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, V. R. O.; CANUTO, J. W.; OLIVEIRA, D. C.; PEREIRA, D. C. S. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 259-268, 2017.

MOSSO, A. L.; LOBO, M. O.; SAMMÁN, N. C. Development of a potentially probiotic food through fermentation of Andean tubers. **LWT - Food Science and Technology**, v.71, p.184-189, 2016.

MOZZI, F. **Lactic Acid Bacteria**. Encyclopedia of Food and Health, Elsevier, 2016. p. 501-508.

NAM, E. S.; AHN, J. K. Isolation of *Lactobacillus curvatus* KNOUC4148 from Kimchi and its properties as a probiotic. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 284-296, 2016.

NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A, M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology,** v. 21, p. 49-53, 2016.

NGUYEN, D. T. L.; HOORDE, K. V.; CNOCKAERT, M.; DE BRANDT, E.; AERTS, M.; THANH, L. B.; VANDAMME, P. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, p.19-27, 2013.

NOUT, M. J.; SARKAR, P. K .; BEUCHAT, L. R. Indigenous fermented foods. *In*: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3.ed. ASM Press: Washington, DC, 2007. p. 817–835.

OLIVEIRA, D. C. de.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L.; MARTINS, G. B.; BINOTI, M. L.; CAMPOS, A. N. R ; RAMOS, A. M.; SILVA, M. H. L.; STRINGHETA, P. C. Blanching effect on the bioactive compounds and on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG before and after in vitro simulation of the digestive system in jabuticaba juice. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1277-1294, 2017.

OLIVEIRA, M. A. de.; SOUZA, de. V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. de. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v.22, p. 1400–1403, 2011.

PALOMINO, J. M.; ARBOL, J. T. D.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A.; PULIDO, R. P. Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. **Food Science and Technology**, v. 60, p.788-794, 2015.

PANDA, S. K.; BEHERA, S. K.; QAKU, X. W.; SEKAR, S.; NDINTEH, D. T.; NANJUNDASWAMY, H. M.; RAY, R. C.; KAYITESI, E. Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. **LWT - Food Science and Technology,** v.75, p.453-459, 2017.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v.21, p. 80-89, 2018.

PARUSSOLO, G.; BUSATTO, R. T.; SCHMITT, J.; PAULETTO, R.; SCHONS, P. F.; RIES, E. F. Synbiotic ice cream containing yacon flour and *Lactobacillus acidophylus* NCFM. **LWT - Food Science and Technology,** v. 82, p. 192-198, 2017.

PENNA, A. L. B.; TODOROV, S. D. Bio Preservation of Cheese by Lactic Acid Bacteria. **EC Nutrition**, v. 4, p. 869-871, 2016.

PERES, C. M.; PERES, C.; MENDOZA, A. H.; MALCATA, F. X**.** Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology,** v.1, p.31-42, 2012.

PERRICONE, M.; BEVILACQUA, A.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages**, v. 1, p.95-103, 2015.

PETRULÀKOVÀ, M.; VALÌK, L. Legumes as Potential Plants for Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v.63, p.1505-1511, 2015.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. and oligofructose in diferente package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 415 – 422, 2015.

PIRES, B. de. A. **Viabilidade de *lactobacillus rhamnosus* GG em bebida mista probiótica de abacaxi com juçara e sobrevivência desta bactéria ao trato gastrointestinal humano.** 2016. 64f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG.

PISANO, M. B.; VIALE, S.; CONTI, S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MELIS, M. P.; DEIANA, M.; COSENTINO, S. Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. **Bio Med Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

PITINO, I.; RANDAZZO, C. L.; MANDALARI, G.; LO CURTO, A.; FAULKS, R. M.; LE MARC, Y.; BISIGNANO, C.; CAGGIA, C.; WICKHAM, M. S. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1121–1127, 2010.

PRATES, F. C. **Desenvolvimento de suco misto de juçara e manga adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* GG submetido ao estresse ácido e bárico subletal.** 52f. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; LICCIARDELLO, F.; MURATORE, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures**.** **Food Science and Technology**, v.33, p. 652-659, 2013.

RATHORE, S.; SALMERÓN, I.; PANDIELLA, S. S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiology**, v.30, p.239-244, 2012.

REGO, R. A. Fatores de influência do mercado. *In*: REGO, R. A.; VIALTA, A.; MADI, L. F. C. (ed.). **Brasil Beverage Trends 2020**. Campinas, SP: ITAL, 2016. Cap. 2, p. 29-51.

REUNANEN, J.; OSSOWSKI, I.; HENDRICKX, A. P.; PALVA, A.; VOS, W. M. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 78, p. 2337-2344, 2012.

RIBEIRO, A.; RAIMUNDO, A.; LARANJEIRA, C.; MIRA, H.; DIAS, I.; FARO, M. Desenvolvimento de diferentes formulações de *Chutney*. **Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém,** p.164-176, 2013.

RÖßLE, C.; AUTY, M. A. E.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; BUTLER, F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria**. Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.1, p. 203–209, 2010.

RODRIGUES, M. Z. **Obtenção de revestimentos comestíveis a base de pectina como veículo para micro-organismos probióticos e aplicação em cenoura e goiaba minimamente processadas**.100f. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

RUSSO, P.; PEÑA, N.; CHIARA, M. L. V. de.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G.; SPANO, G. Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. **Food Research International**, v.77, p.762-772, 2015.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; OLIVEIRA, R. P. DE S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bactéria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SALMERÓN, I.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S. S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Journal of functional foods**, v. 15, p. 106 – 115, 2015.

SALMINEN, S.; KNEIFEL, W.; OUWEHAND, A. C**.** Probiotics: Application of Probiotics in Dairy Products: Established and Potential Benefits. **Reference Module in Food Science**, p. 1-8, 2016.

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

SHEN, X.; YI, D.; NI, X.; ZENG, D.; JING, B.; LEI, M.; BIAN, Z.; ZENG, Y.; LI, T.; XIN, J. Effects of *Lactobacillus plantarum* on production performance, immune characteristics, antioxidant status, and intestinal microflora of bursin-immunized broilers. **Can. J. Microbiol,** v.60, p.193-202, 2014.

SIEZEN, R. J.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-13, 2011.

SILVA, F.J. M.; FERNANDES, C. M.; LIMA, D. C. N.; MADEIRA, R. O.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L.; LAMAS, J. M. N.; RAMOS, A. M. Stability of *Lactobacillus acidophilus*

and *Lactobacillus rhamnosus* in minimally processed cabbage. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation,** v. 3, p. 140–150, 2013.

SHUKLA, M.; JHA, Y. K.; ADMASSU, S. Development of probiotic beverage from whey and pineapple juice. **Journal of Food Processing Technology**, v. 4, p. 1-4, 2013.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. de. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCO, V. The potential of probiotics. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p.413-434, 2010.

STRINGHETA, P. C.; AQUINO, A. M.; VILELA, M. A. P. Legislação Brasileira sobre Alimentos "Funcionais". *In*: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (ed.). **Alimentos Funcionais - componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. Cap. 2, p. 09-35.

SWAIN, M. R.; ANANDHARAJ, M.; RAY, R. C.; RANI, R. P. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. **Hindawi Publishing Corporation Biotechnology Research International**, 2014.

TAMANG, J. P. Himalayan fermented foods: Microbiology nutrition, and ethnic values. CRC Press. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 598, 2011.

TODOROV, S. D; HOLZAPFEL, W. H. Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. **Advances in fermented foods and beverages,** p.123-153, 2015.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

TULINI, F. L.; WINKELSTROTER, L. K.; DEMARTINIS, E. C. P. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. **Anaerobe**, v.22, p.57-63, 2013.

VALERIO, F.; de BELLIS, P.; LONIGRO, S. L.; MORELLI, L.; VISCONTI, A.; LAVERMICOCCA, P. *In vitro* and *in vivo* survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3042-3045, 2006.

VARELA, L. V.; MADIEDO, P. R.; GUEIMONDE, M. *In vitro* fermentation of different fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* strains for the selection of synbiotic combinations. **International Journal of Food Microbiology**, v.242, p.19-23, 2017.

VASCONCELOS, B. G.; MARTINEZ, R. C. R.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Innovative açaí (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food science and biotechnology**, v. 23, p. 1843-1849, 2014.

VASUDHA, S.; MISHRA, H. N. Non dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 7-15, 2013.

VRIES, M. C. de.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. de. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

WAKIL, S. M.; LABA, S. A.; FASIKU, S. A. Isolation and identification of antimicrobial-producing lactic acid bacteria from fermented cucumber. **Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 2556-2564, 2014.

WANG, C. Y.; LIN, P. R.; NG, C. C.; SHYU, Y. T. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the faeces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. **Anaerobe**, v.6, p. 578–585, 2010.

WANG, X.; KONG, D.; MA, Z.; ZHAO, R. Effect of carrot puree edible films on quality preservation of fresh-cut carrots. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 54, p. 64–71, 2015.

WGO. WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. Probióticos e prebióticos**. 2017. Disponível em https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf. Acesso em: 06 jun. 2020.

XIONG, T.; PENG, F.; LIU, Y.; DENG, Y.; WANG, X.; XIE, M. Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, p.713 – 717, 2014.

YANG, Z.; LI, S.; ZHANG, X.; ZENG, X.; LI, D.; ZHAO, Y.; ZHANG, J. Capsular and slime polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 53 - 57, 2010.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 73–75, 2005.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. V.; KUMAR, A.; HARDWIDGE, P. R.; GOVIND, R.; TANAKA, T.; KONDO, A. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 279-288, 2016.

ZYCHAR, B.C.; OLIVEIRA, B.A. Fatores desencadeantes da intolerância á lactose: metabolismo enzimático, diagnóstico e tratamento. **Atas de Ciência da Saúde**, São Paulo, v.5, p. 35-46, 2017.

CAPÍTULO 4 - QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO: MATURAÇÃO E SEGURANÇA ALIMENTAR

Sâmya Petrina Pessoa Oliveira
Rosana Campos do Vale
Vanessa Riani Olmi Silva
Cristina Henriques Nogueira
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
José Manoel Martins

1. INTRODUÇÃO

A produção de queijos no Brasil tem aumentado gradativamente nos últimos anos com a demanda impulsionada pela elevação do poder aquisitivo da população. Somente os queijos inspecionados, em 2013, ultrapassou a produção de 1,0 milhão de toneladas (ITAL, 2017).

Os queijos artesanais, devido à sua singularidade, estão ganhando cada vez mais espaço junto ao comércio de queijos finos no Brasil, atingindo uma classe com poder aquisitivo mais elevado e com maior conhecimento de produtos com qualidade. Trata-se de um queijo que possui valor social de grande relevância, uma vez que suas regiões produtoras são compostas, em sua maioria, por famílias rurais que estão envolvidas diretamente nessa produção, sendo esta, sua principal ou única fonte de renda. Neste contexto, fica evidenciada a importância histórica, cultural e econômica que este produto representa para o estado de Minas Gerais.

Em razão da sua história, tradição e cultura, o Serro é reconhecidamente uma das mais importantes regiões produtoras de queijo artesanal no Brasil. Segundo essa premissa, o Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais – IEPHA-MG registrou “o modo de fazer” do queijo Minas artesanal do Serro como “Patrimônio Imaterial de Minas Gerais”. Por meio do Decreto nº 42.505 de 15 de abril de 2002, o IEPHA-MG (2002) destaca o potencial econômico do patrimônio preservado e a necessidade de ampliar a consciência sobre a importância dos bens representativos de Minas Gerais, tais como o queijo Minas artesanal (SILVA et al., 2011).

Embora o seu “modo de fazer” seja secular, nos últimos anos, alguns produtores da região do Serro têm substituído um dos seus principais ingredientes, o “pingo”, pela “rala”, que é uma fração do queijo ralado e adicionada ao leite no momento da fabricação. A principal justificativa da mudança está baseada na melhoria da consistência do queijo,

principalmente nos primeiros dias após a fabricação, quando os queijos, mesmo em estações mais frias, conseguem ser comercializados com tempo inferior a 5 dias.

Entretanto, esta mudança tem provocado o questionamento de consumidores e da própria Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro em relação às características do produto final. O principal questionamento é que, se com “rala” é mantido o mesmo padrão de qualidade do queijo fabricado com "pingo".

Deve ser considerado que o Estado de Minas Gerais está na vanguarda no que se refere à regulamentação de queijos artesanais, inclusive servindo de referência e motivação para que pequenos produtores de outros estados se articulem quanto às necessidades de certificação. Exemplo dessa articulação é a proposição de uma nova legislação para os queijos artesanais do estado de Minas Gerais, que está em trânsito na Assembleia Legislativa de Minas Gerais, podendo, caso justificado, incluir na fabricação de queijo Minas artesanal o uso da “rala”, caso se comprove que a mesma não traz prejuízos à qualidade dos queijos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijo Minas artesanal: histórico, particularidades e aspectos legais de sua produção

O início da pecuária leiteira no Brasil se deu com a chegada dos primeiros animais em 1534, por meio de Martim Afonso de Souza, levando para as minas de ouro de Minas Gerais a arte de fazer queijo de maneira artesanal, como um método de conservação do leite (DIAS et al., 2016). Um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil é o queijo Minas artesanal, sendo responsável pela geração de renda de um grande número de pequenos produtores rurais e representando uma forma de subsistência de inúmeras famílias no meio rural, além da ser símbolo cultural das regiões produtoras (DORES; FERREIRA, 2012; COSTA JÚNIOR et al., 2014).

O Brasil tem sua história relacionada com a arte de fazer queijos. Pelos vales e montanhas do país, milhares de produtores continuam com a tradição secular. Entre os queijos produzidos nas agroindústrias familiares, o queijo Minas artesanal é amplamente difundido no estado de Minas Gerais e em todo país, pela tradição cultural, e pelo seu sabor peculiar (SPERAT-CZAR, 2012).

É um produto da coagulação do leite e o fermento empregado é composto por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (95%) e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (5%) (MACHADO et. al., 2004), quando fabricado industrialmente. Já o queijo Minas artesanal, que é o queijo produzido com leite cru, possui inúmeras diferenças quando comparados aos queijos pasteurizados devido a sua diversidade de microrganismos. Não apenas em quantidade, mas em diversidade, o que os tornam complexos e saborosos, além de possuir inúmeros compostos aromáticos únicos, que estarão relacionados à região onde são produzidos, provenientes das pastagens e das queijarias onde são fabricados (SPERAT-CZAR, 2012).

Segundo Silva et al. (2011), os queijos artesanais, fabricados diretamente na fazenda a partir de leite cru, acrescentam 70 mil toneladas/ano à oferta nacional e mantém na atividade em torno de 27 mil produtores. Desses, 10.773 são produtores rurais de quatro principais regiões (Serro, Serra da Canastra, Cerrado e Araxá) que produzem, anualmente, 33.570 mil toneladas de queijo/ano.

A presença do queijo Minas artesanal (QMA) se espalha por mais 3 regiões do estado, Serra do Salitre, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro. Juntas essas sete regiões são responsáveis por mais da metade de todo queijo artesanal produzido em Minas Gerais. Destaca-se ainda que 519 dos 853 municípios do estado são produtores de queijos artesanais, contribuindo para a manutenção da tradição e cultura do povo mineiro (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; SILVA, 2015).

Assim, o processo de produção do queijo Minas artesanal se dá por várias décadas e com o objetivo de resguardar a segurança alimentar dos consumidores, o Governo do Estado de Minas Gerais criou leis específicas para os queijos Minas Artesanais (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2008; MINAS GERAIS, 2018), que definem critérios de funcionamento, produção e comercialização desses queijos, as quais seguem os mesmos critérios microbiológicos estipulados pela Legislação Federal (BRASIL, 1996) para queijos industriais de alta umidade.

A Lei Estadual supracitada não estabelece apenas os parâmetros microbiológicos, mas também determina quais os critérios de qualidade para o processamento, obtenção da matéria-prima, da água e adequação das queijarias, currais, equipamentos, utensílios e manipuladores (DORES, 2007).

Neste sentido a Lei n° 14.185, de 31 de janeiro, regulamentada pelo Decreto n° 42.645 de 5 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002), define o queijo Minas Artesanal como sendo todo queijo produzido conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for elaborado, sempre utilizando como matéria prima o leite integral da vaca, fresco e cru, sem nenhum tratamento térmico, sendo este retirado e beneficiado na propriedade de origem, apresentando consistência firme, cor e sabor próprios, além de uma massa uniforme, isenta de corante e conservantes. De acordo com esta Lei, o processamento do queijo Minas Artesanal deve ter início até noventa minutos após o começo da ordenha e, na fabricação, devem ser utilizadas como ingredientes culturas láticas naturais como soro fermentado ("pingo"), coalho e sal.

As boas práticas agropecuárias regulam a produção do queijo Minas Artesanal por meio de quatro portarias: Portaria n.º 517, de 14 de junho de 2002 (IMA, 2002a), a Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002 (IMA, 2002b), Portaria nº 523, de 23 de julho de 2002 (IMA, 2002c), e a Portaria nº 818 (MINAS GERAIS, 2006).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), por meio da Portaria n° 517 de 14 de junho (IMA, 2002a), determinou normas de defesa sanitária para os rebanhos provisores de leite para a produção do queijo artesanal, dentre estas está a obrigatoriedade da vacinação contra febre aftosa, raiva e brucelose além do controle de mastite e parasitas no rebanho. No caso das vacinas, o produtor deve realizar os testes e apresentar a comprovação anualmente no IMA.

A Portaria n° 518 (IMA, 2002b) dispõe sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação de queijo Minas artesanal, descrevendo desde o curral e sala de ordenha até os equipamentos utilizados na produção. Posteriormente, no mesmo ano, entrou em vigor a portaria n° 523 (IMA, 2002c) que trata das condições higiênico-sanitárias e das boas práticas de manipulação e fabricação do queijo Minas artesanal.

Por fim, a Portaria n° 818 (MINAS GERAIS, 2006), de 12 de dezembro de 2006, dispõe sobre a aprovação do regulamento técnico para a produção de queijo Minas artesanal e traz as normas para o funcionamento dos centros de distribuição, procedimentos para coleta de amostras, parâmetros para avaliação de risco, documentos necessários para cadastro junto ao programa queijo Minas artesanal da EMATER MG e as regras de rotulagem do produto.

Além das portarias supracitadas, há o decreto n° 44.864/08, que modifica o regulamento da lei n° 14.185/02, abordando sobre a produção de queijo Artesanal, delimitando a área e a condição para a produção do queijo, a qualidade do produto e da água utilizada, bem como a embalagem, transporte e comercialização desse queijo, além do período necessário para maturação (MINAS GERAIS, 2008).

A Lei n° 19.492 foi criada em 13 de janeiro de 2011 e veio com o propósito de alterar alguns dispositivos referentes à produção do queijo Minas artesanal conforme a Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, incluindo a rotulagem com demarcação da região, conforme regulamento, dentre outros aspectos cadastrais (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2011).

A legislação mais recente para queijos artesanais em Minas Gerais é a lei estadual nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018 (MINAS GERAIS, 2018), que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, define o papel do estado e a fiscalização e ainda revoga a lei estadual nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012.

Devido ao risco potencial que representava a comercialização do queijo artesanal de leite cru, a legislação brasileira estabeleceu 60 dias de maturação para a garantia da sua segurança alimentar (BRASIL, 1996). Todavia, a partir da Instrução Normativa n° 30, do Ministério da Agricultura, a comercialização passou a ser permitida desde que fossem cumpridas determinadas condições, como valores de umidade e contagens microbiológicas, ou ainda, se estudos técnicos científicos comprovassem que a redução no período de maturação não comprometesse a qualidade e inocuidade do queijo (BRASIL, 2013).

2.2. Queijo Minas artesanal do Serro

O município do Serro está localizado numa região montanhosa, na vertente oriental da Serra do Espinhaço, entre os paralelos 18º e 19º de latitude Sul na região do Alto do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais. À microrregião do Serro pertencem os seguintes municípios: Rio Vermelho, Serra Azul de Minas, Santo Antônio do Itambé, Serro, Materlândia, Paulistas, Sabinópolis, Alvorada de Minas, Dom Joaquim, Conceição do Mato Dentro e Coluna, reconhecidos pela Portaria n° 546 (IMA, 2002d), Portaria nº 591 (IMA, 2003) e Portaria nº 1152 (IMA, 2011). É uma região composta por 1.050 produtores

que colocam anualmente no mercado 3.100 toneladas do produto artesanal, sendo este o principal produto da região. Esta atividade gera 2.625 empregos diretos (EMATER, 2004).

O início da fabricação do queijo típico da região do Serro remete ao período colonial, quando os mineiros começaram a colocar em prática a herança portuguesa. Desde o século XVIII garimpeiros vindos de Portugal em busca do ouro, passaram a fabricar o queijo com processamento adaptado àquele adotado pelo queijo da Serra da Estrela, feito a partir de leite de ovelha, tendo como finalidade o consumo próprio. Porém, devido à dificuldade de acesso, os produtores tinham que conservar o fermento estabelecendo assim a prática da utilização do "pingo" (MUNDO DO LEITE, 2003). Introduzida pelos colonizadores portugueses, esta tradição se confunde com a história da cidade.

Esse processo de fabricação dos queijos Minas artesanais é uma tradição secular que passa de geração em geração. É um processo manual e segue normas regulamentadas que abrangem a produção de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização de técnicas industriais (MINAS GERAIS, 2002).

O modo de se fazer o queijo artesanal envolve em, logo após a ordenha, manual ou mecânica, submeter o leite à filtração, por meio de filtro ou tecido sintético. Em seguida, o leite é transferido para o tanque de fabricação por meio de um funil de passagem, quando então é adicionado o “pingo” e o coalho (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2013). Após a coagulação, a coalhada é deixada em repouso por cerca de cinco minutos, seguido de agitação lenta de, aproximadamente, meia hora, até a obtenção da massa firme. A partir daí, é eliminada parte do soro e feita à compressão da massa nas formas, com as mãos. A salga é realizada primeira em um lado do queijo e, após duas horas, no outro lado. O "pingo" é coletado em recipiente higienizado, de um dia para o outro, para ser usado na próxima fabricação. Os queijos são tirados da forma no dia posterior, maturados, e por fim, levados para o comércio (MINAS GERAIS, 2018).

O queijo do Serro possui características semelhantes às do queijo Minas comum, sendo classificado como uma de suas variedades. A utilização do "pingo" é uma característica marcante, sendo este conhecido como o fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados, e coletados de um dia para o outro, sendo, portanto, um soro fermentado com certa quantidade de sal, que pode agir como inibidor de algumas

fermentações indesejáveis e confere ao queijo características físico-químicas típicas de sua variedade (PINTO, 2004).

A "rala" por sua vez é um produto ralado, obtido a partir de um queijo já maturado, que quando utilizado origina um produto mais firme, com textura desejada para comercialização.

Fabricado ao redor da Serra do Espinhaço, o queijo Minas artesanal do Serro apresenta consistência semidura, textura compacta, branco-amarelado, de sabor brando ao ligeiramente ácido. De formato cilíndrico pesando até 1 kg, possui aproximadamente 14 cm de diâmetro e altura variando de 4 a 6 cm e passa por um processo de maturação de sete dias no mínimo sem incidência de luz solar (BARROSO; GONÇALVES; BARBOSA, 2002). Essas medidas podem variar dependendo da unidade produtora. A casca é esbranquiçada quando fresca e amarelada, se maturado. A elasticidade da massa e sua resistência variam com o grau de maturidade do queijo. É um queijo de massa cega, com pequenas olhaduras mecânicas (PINTO, 2004).

O queijo Minas artesanal do Serro é aquele elaborado em queijarias individuais ou coletivas, a partir de leite cru, inócuo, integral e recém-ordenhado, cujo funcionamento seja limitado ao leite da própria fazenda e possuir cadastro no IMA (MINAS GERAIS, 2008).

2.3. Processo de maturação dos queijos

O processo de fabricação de queijos envolve essencialmente a concentração de gordura e caseína do leite através da coagulação da caseína por meio de enzimas, induzindo a sinérese do coágulo a qual pode ser controlada pelo uso de várias combinações de tempo, temperatura, pH, agitação e pressão. Ao final do processamento a massa é uma matriz de para-caseinato de cálcio contendo proporções de lipídeos cuja concentração varia de 35 – 50% (PINTO, 2004).

A maturação dos queijos ocorre sob a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, onde uma série de fatores de ordem biológica, química e bioquímicas acontece numa sucessão complexa, modificando as propriedades químicas e físicas da massa do queijo, influenciando a textura e consistência e formando compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento do sabor característico de cada variedade (FOX; Mc SWEENEY, 1998).

O que determina a extensão com que tais eventos ocorrem são as condições ambientais onde os queijos se encontram para maturação, tais como a umidade relativa do ar e a temperatura. A primeira controlará a secagem dos queijos e selecionará a microbiota, e a segunda quando mais elevada proporcionará um amadurecimento mais rápido do produto. Também os fatores intrínsecos ao queijo são importantes no processo de maturação. Fatores como pH, teor de sal e umidade na massa, bem como o tipo de microrganismo(s) presente(s) de forma endógena ou presentes no fermento lático usado na fabricação, vão desempenhar um papel de destaque na formação do sabor e textura dos queijos maturados (BANK, 1998). Já em queijos frescos, o sabor surge a partir da produção do ácido lático e de compostos aromáticos voláteis da fermentação da lactose por bactérias *starters* no processo de maturação (ALAIS, 2003).

A maturação de queijos é um processo complexo que envolve a degradação gradual de proteínas, carboidratos e lipídeos. Consiste em uma série de eventos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem na massa do queijo sob a influência de fatores ambientais e ácidos orgânicos e enzimáticos produzidos principalmente pela microbiota natural do leite. O processo de maturação necessita de um tempo específico de armazenamento após a fabricação para que os atributos sensoriais típicos do mesmo se desenvolvam. O tempo de maturação pode variar de semanas a vários meses, em função do tipo de queijo (UPADHYAY et al., 2004; DOLCI et al., 2010; SIHUFE et al., 2010).

Os principais eventos ocorridos durante o processo de maturação em queijos são a hidrólise das caseínas (proteólise) e da gordura (lipólise), e, a fermentação da lactose. Estes são dependentes da composição do leite, do processo de fabricação, do pH, do teor de sal, da atividade de água, da temperatura de armazenamento, e, principalmente, do tipo de fermento presente no queijo (McSWEENEY, 2004; UPADHYAY et al., 2004). No decorrer do processo, reações bioquímicas primárias e secundárias acontecem na massa. A fermentação da lactose, a lipólise e a proteólise fazem parte das reações primárias, enquanto as secundárias são as representadas pelo metabolismo das gorduras até ácidos graxos de baixo peso molecular e pelo metabolismo das caseínas até peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (FOX; Mc SWEENEY, 1998).

Os principais grupos microbianos envolvidos na maturação são os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e as bactérias propiônicas nos queijos suíços. A população total ultrapassa 10^9UFC/g que varia pouco durante a maturação, entretanto o

equilíbrio entre os diferentes grupos microbianos, e, por conseguinte, a importância relativa das populações está em constante evolução (ECK, 1987). Estes gêneros de microrganismos são responsáveis pela produção de ácidos orgânicos e compostos aromáticos que vão contribuir para as características finais dos queijos, sendo também responsáveis pelo sabor característico e pela segurança do produto (PINTO, 2004).

Estudos realizados por Martins et al. (2015), mostraram que o queijo Minas artesanal fabricado na região do Serro, com a maturação à temperatura ambiente apresentou níveis aceitáveis na contagem de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em ambos os períodos de fabricação, na estação seca e no período chuvoso. Sob refrigeração, no entanto, o tempo mínimo de maturação foi de 33 dias na estação seca e 63 dias na estação chuvosa.

2.3.1. Principais fenômenos durante a maturação de queijos

Segundo Ordónez (2005) as principais reações bioquímicas que ocorrem no queijo durante a maturação são: glicólise, proteólise, lipólise, que afetam a textura, sabor e aroma finais do produto.

2.3.1.1. Glicólise e fermentação lática

O principal açúcar dos queijos é a lactose, e sua degradação por meio da fermentação lática, ocorre na maturação. Em torno de 98% da lactose é removida com o soro e a lactose residual é degradada por bactérias do próprio leite ou da cultura lática, produzindo ácido lático. O metabolismo da lactose residual é essencial para a formação de queijos de boa qualidade (FOX et al., 1997).

Assim, produção do queijo Minas Artesanal tem como etapa inicial a acidificação do leite e da coalhada a partir da degradação da lactose, por cepas selecionadas de bactérias láticas que transformam o carboidrato em ácido lático. A principal função das bactérias láticas neste processo é a conversão da lactose do leite em ácido lático. A produção de ácido lático contribuirá para o rápido abaixamento do pH, afetando desta forma significativamente o crescimento de patógenos e microrganismos deteriorantes (ORDÓÑEZ, 2005). Além disso, a acidificação favorece a retirada de soro da coalhada, contribuindo assim para a preservação do produto pela redução do teor de umidade (ECK, 1987).

O grau de acidificação da coalhada é um fator importante na determinação do teor de umidade, e também possui relevância no nível de proteólise que o queijo atingirá durante a maturação, uma vez que determina o grau de desmineralização da caseína, fator este que incrementa o grau de suscetibilidade da coalhada às proteases e estabelece a quantidade de enzima coagulante que será retida (ORDÓÑEZ, 2005).

O principal metabólito das bactérias láticas homofermentativas é o ácido lático, sendo produzidas quatro moléculas de ácido lático para cada molécula de lactose metabolizada. Já as bactérias heterofermentativos, liberam 2 moléculas de ácido lático para cada molécula de lactose metabolizada, além de produzir também dióxido de carbono, ácido acético e etanol (ORDÓÑEZ, 2005).

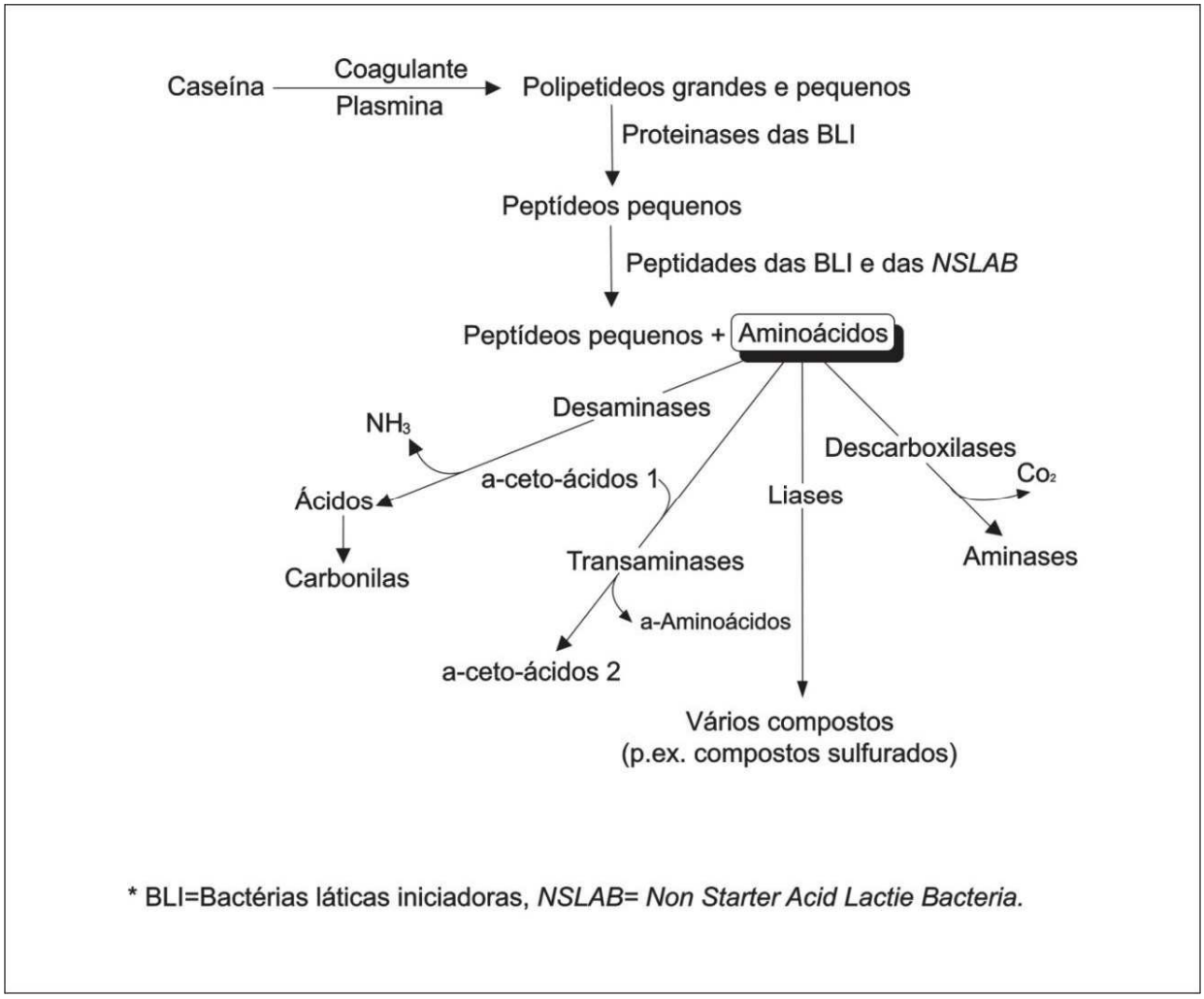
2.3.1.2. Proteólise

Dos três principais eventos bioquímicos na maturação de queijos, a proteólise é o mais complexo e o que possui o maior grau de importância. Ela é considerada a principal reação de formação de peptídeos e aminoácidos livres durante a maturação (VISSER, 1993). A proteólise pode ser definida como a hidrólise das caseínas por meio da ação proteolítica das enzimas presentes no coagulante residual retido na coalhada e das proteinases naturais presentes no leite, o que resulta na produção de grande quantidade de peptídeos de massa molecular elevada e média (primeira fase da proteólise). Estes vão ser hidrolisados a peptídeos pequenos e aminoácidos (Figura 1) pelas proteinases e peptidases do fermento lácteo, das *Non Starter Lactic Acid Bacteria* (NSLAB) e de fontes exógenas (McSWEENEY, 2004; UPADHYAY et al, 2004).

A proteólise é também a principal responsável pela passagem de uma textura dura e da consistência “borrachenta” presente na coalhada fresca a um corpo de massa flexível, liso, macio e com sabor característico de um queijo curado (FOX; Mc SWEENEY, 1998).

A degradação das caseínas no queijo se deve às proteases microbianas residuais, provenientes do fermento, e de proteínas oriundas do leite como a plasmina (FOX; Mc SWEENEY, 1998). Em todos os queijos, a K-caseína desaparece desde o início da fabricação. Por exemplo, nos queijos maturados por mofos, a β-caseína é a que mais rapidamente se degrada, enquanto nos queijos de pasta dura e semidura, a caseína que mais rapidamente se degrada é as do tipo *αs* (ALAIS, 2003).

Figura 1 - Evolução da proteólise em queijos.



Fonte: McSweeney (2004).

Como resultado destas reações os aminoácidos podem reagir quimicamente com carbonilas por meio da reação de Maillard ou pela degradação Strecker, produzindo assim diversos compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. São também essas reações que poderão produzir certas quantidades de peptídeos hidrofóbicos que levarão ao desenvolvimento do sabor amargo que alguns consumidores vão rejeitar. Porém, numa concentração adequada e balanceada com outros compostos, estes peptídeos amargos podem contribuir de forma positiva com o sabor do queijo (FOX; Mc SWEENEY, 1998).

Na primeira etapa ocorre a quebra das caseínas em longas cadeias peptídicas por ação das endopeptidases, que são as proteases, essa quebra afeta a consistência do

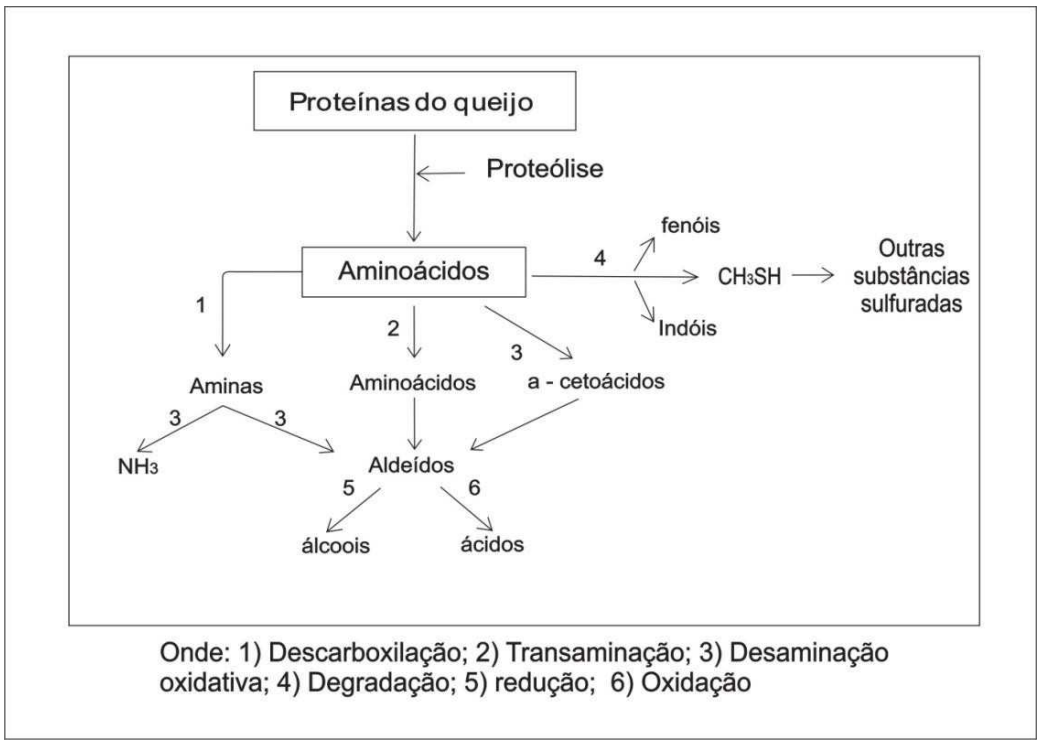
queijo. A segunda etapa é marcada pela quebra dos peptídeos menores pela ação de carboxipeptidases e aminopeptidases em aminoácidos livres que contribuirão para o sabor do queijo.

Na terceira etapa, a transformação dos aminoácidos livres ocorrem por meio de uma série de enzimas catabólicas que dependem da cultura lática secundária e das condições físico-químicas, principalmente do pH do queijo, formando compostos aromáticos da degradação destes aminoácidos em aminas, aldeídos, álcoois, lactonas e cetonas, ésteres, compostos fenólicos e sulfurados (ALAIS, 2003).

As principais vias de degradação de aminoácidos que acontecem em queijos por enzimas microbianas são basicamente: descarboxilação, transaminação, desaminação oxidativa e degradação, seguidas de processos comuns de oxidação e redução (FOX, MCSWEENEY, 1998; ALAIS, 2003; PERRY, 2004), conforme esquema geral da Figura 2.

Não existe uma correlação direta entre o aroma dos queijos e a concentração dos aminoácidos livres, mas sabe-se, que estes podem ser metabolizados por enzimas bacterianas produzindo produtos menores, entre os quais os que apresentam características relacionadas ao sabor (PERRY, 2004).

Figura 2 - Principais vias de degradação de aminoácidos pela ação microbiana durante a maturação de queijos.



Fonte: Perry (2004).

Alais (2003) apresenta uma explicação detalhada das quatro principais vias de degradação de aminoácidos: Descarboxilação: Marcada pela liberação de gás carbônico e produção de uma amina. Esta atividade manifesta-se sobre tudo em aminoácidos portadores de um terceiro grupo polar, formando-se uma amina biogênica. Algumas destas aminas são substâncias tóxicas, formam-se em alimentos muito hidrolisados como queijos e pescados em estado avançado de fermentação.

1. Transaminação: É a transferência reversível do grupo amina de aminoácidos para um alfa cetoácido sem a liberação de NH_3.
2. Desaminação Oxidativa: Ocorre a produção de amônia, ácido cetônico e tirosina. Também pode ocorrer a desaminação redutora com a formação de um ácido alifático pela ação de bactérias anaeróbicas.
3. Degradação de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) levando à produção de sulfetos.

2.3.1.2.1. Índice de extensão e profundidade de maturação

A proteólise, sendo o parâmetro mais utilizado como indicador de maturação, pode ser expressa por meio de índices de extensão e profundidade de maturação. No entanto, não há uma divisão precisa onde começa um índice e termina o outro (NARIMATSU et al., 2003).

Estes índices aumentam com o avanço da maturação e são estimados pela proteólise da caseína em peptídeos e aminoácidos solúveis em filtrados ácidos preparados de queijo, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica (PERRY, 2004).

O índice da extensão da maturação quantifica ou mensura os peptídeos (solúveis) de alta massa molecular, produto da ação proteolítica das enzimas do coalho sobre as caseínas do queijo, sendo liberados para a fase aquosa deste (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989). A extensão é um fator indicativo da proteólise primária (BECH,1993).

A determinação analítica do índice de extensão de maturação é baseada na precipitação isoelétrica da caseína a pH 4,6 em uma amostra diluída de queijo e na quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl. O índice de

extensão de maturação é determinado pela seguinte fórmula (WOLFSCHOON- POMBO; LIMA, 1989):

$$IEM = (\% NS_{(pH4,6)} / \% NT) \times 100$$

Em que:

IEM = índice de extensão de maturação;

NS = nitrogênio solúvel em pH 4,6;

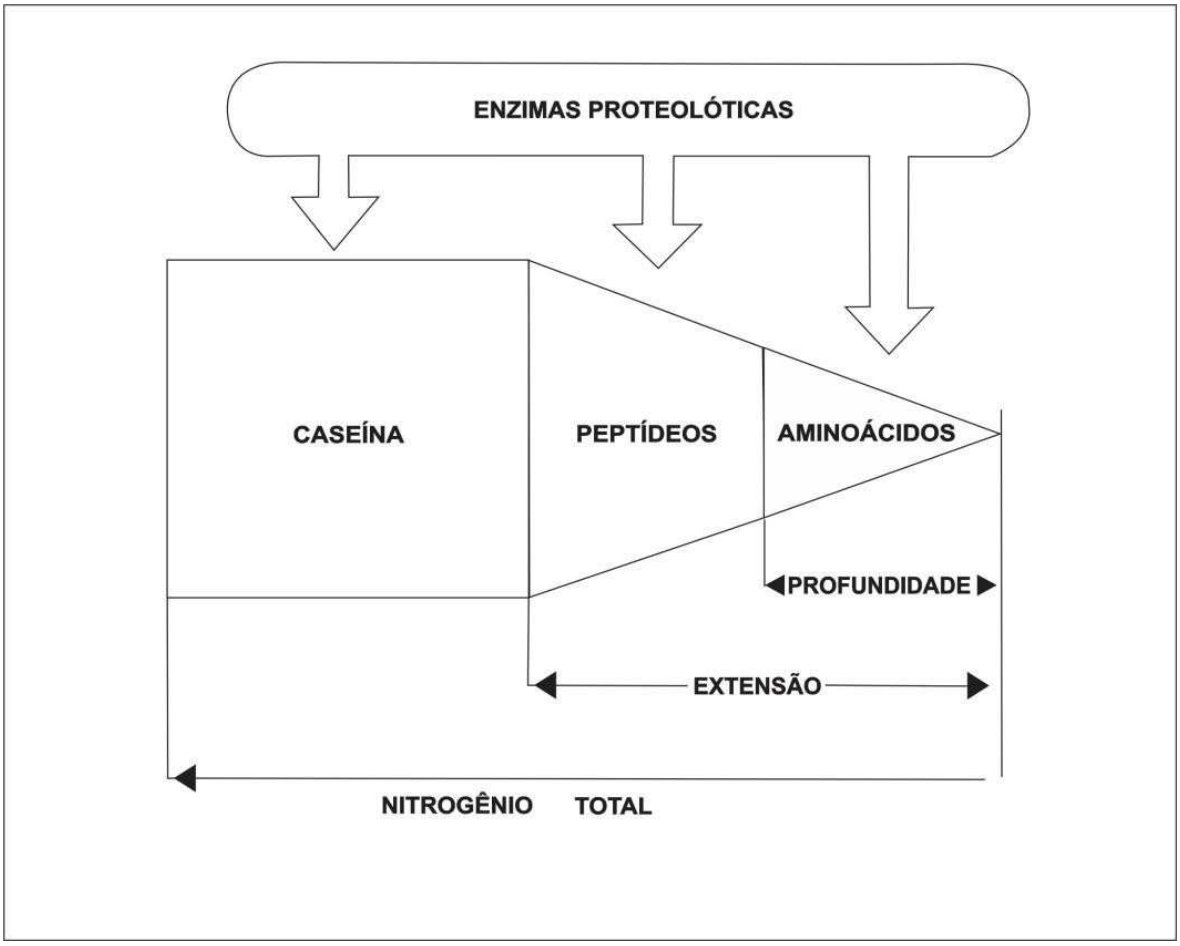
NT= nitrogênio total.

O índice de extensão, que mede o desdobramento do nitrogênio total em nitrogênio solúvel a pH 4,6, está basicamente relacionado com as proteinases naturais do leite como a plasmina e do agente coagulante, as quais degradam a proteína em peptídeos de alto e médio peso molecular (proteólise primária) (MORENO et al., 2002; NARIMATSU et al., 2003; FERREIRA, 2004). As diferenças no conteúdo de nitrogênio solúvel a pH 4,6 nos queijos devem-se à temperatura de cozimento da massa do queijo, ao pH do soro drenado, ao conteúdo de umidade e pH do queijo, e ao tempo e temperatura de maturação (McSWEENEY, 2004).

O índice de profundidade da maturação quantifica ou mensura a formação de substâncias de baixa massa molecular (aminoácidos, oligopeptídeos e aminas) acumuladas durante o período de maturação, produto da ação proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados oriundos da degradação primária das caseínas (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989).

Estes compostos são os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989). Esse índice está relacionado principalmente com a atividade das endo e exoenzimas da cultura lática empregada na fabricação do queijo e de possíveis contaminantes, que degradam os peptídeos de alto e médio peso molecular, oriundos da degradação da caseína, em peptídeos de baixo peso molecular (Figura 3), os quais em excesso, conferem o sabor amargo aos queijos e em substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, como aminoácidos, oligopeptídeos, aminas, uréia e amônio (OLIVEIRA, 2001; MORENO et al., 2002; NARIMATSU et al., 2003; FERREIRA, 2004; PEROTTI et al., 2004).

Figura 3 - Esquema da extensão e da profundidade de proteólise em queijos.



Fonte: Wolfschoon-Pombo; Lima (1989).

A quantificação do índice de profundidade pode ser obtida pelo teor de nitrogênio não proteico (NNP), os quais são solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 12%, ou pela determinação direta do aminoácido produzido e expresso como percentual de proteína solúvel total (OLIVEIRA, 2001; WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989).

$$IPM = (\% NNP / \% NT) \times 100$$

Em que:

IPM = índice de profundidade de maturação;

NNP = nitrogênio não protéico;

NT = nitrogênio total.

Os índices proteolíticos podem ser avaliados através da utilização de técnicas objetivas, como precipitação fracionada com ácidos ou solventes, eletroforese, cromatografia, espectrofotometria e métodos subjetivos como provas sensoriais (VENEMA; HERSTEL; ELENBAAS, 1987).

2.3.1.3. Lipólise

Durante a maturação, ocorre a lipólise, que é uma reação de hidrólise dos triglicerídeos do queijo em ácidos graxos, devido à ação de lipases nativas, endógenas e/ ou exógenas (McSWEENEY; SOUSA, 2000; McSWEENEY, 2004; PERRY, 2004).

Os lipídeos (triacilgliceróis – TAG) presentes no queijo constituem uma importante fonte de sabor e aroma para o mesmo. Segundo Fox et al (2000), McSweeney e Souza (2000), a lipólise ocorre de três maneiras:

1. Os TAGs podem sofrer degradação oxidativa, levando à formação de vários aldeídos insaturados de aroma intenso, causando o defeito conhecido como ranço oxidativo. No entanto, a extensão da oxidação lipídica não é significativa no queijo, visto seu baixo potencial de redução (-250 milivolts).

2. Podem funcionar como solventes de compostos aromáticos desagradáveis ao sabor característico do queijo, oriundos não somente deles, mas também da proteína e da lactose.

3. A hidrólise enzimática (lipólise) dos TAGs a ácidos graxos e glicerol, mono ou diglicerídeos se trata de um importante evento bioquímico ocorrido durante o processo de maturação do queijo que tem sido extensivamente estudado, sobretudo, em variedades de queijos azuis e duros, nos quais é fundamental para a geração do sabor característico. Os ácidos graxos livres, especialmente os de cadeia curta, apresentam sabor intenso e característico. Estes são precursores de vários compostos de sabor e aroma, tais como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos e álcoois secundários.

A lipólise ocorre por ação de enzimas lipolíticas, denominadas lipases. Estas podem provir do leite, do coagulante, do fermento lácteo, das *NSLAB*, de micro-organismos acompanhantes e de preparações de lipases exógenas (FOX et al., 2000; McSWEENEY; SOUZA, 2000).

No processo de maturação dos queijos a primeira alteração sofrida pelo material lipídico é a hidrólise dos triglicerídeos com liberação e acúmulo de ácidos graxos no meio.

São esses ácidos graxos que contribuirão com a formação de sabor e aroma do produto; ou que ainda poderão ser metabolizados em outras substâncias igualmente aromáticas e saborosas (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003; COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2004; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Durante a estocagem dos queijos, lentamente a fração lipídica vai sendo hidrolisada por enzimas lipolíticas naturais ou produzidas por bactérias e fungos, contribuindo assim para sua rancificação. Lipases extracelulares provenientes de alguns tipos de microrganismos podem promover a rancificação em manteiga, liberando ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis por *off-flavors.* No entanto, em outros produtos lácteos, como em queijos, certo nível de lipólise é desejável, pois contribui com a formação do sabor e odor desejável (ARAÚJO, 2011). Além disso, as alterações no material lipídico durante o processo de maturação de queijos não tem influência sobre a textura do produto, mas sim sobre o sabor e aroma (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os fermentos naturais são aqueles tradicionalmente utilizados, principalmente na fabricação artesanal de queijos, onde a microbiota endógena presente no leite cru é utilizada para promover a fermentação da lactose. No entanto, essa microbiota é constituída por misturas de espécies e cepas cuja composição exata é indefinida, modificando o grau de acidificação e, consequentemente, a qualidade do queijo (FOX; MCSWEENEY, 1998; WALSTRA et. al., 1999; LOURENÇO NETO, 2013).

A produção de queijos artesanais é baseada da utilização de leite cru e do "pingo". Esse "pingo" se caracteriza pelo soro fermento salgado e coletado da fabricação anterior para uso na fabricação do dia (MARTINS, 2006; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; IMA, 2011; LOURENÇO NETO, 2013). É composto por bactérias láticas que exercem papel fundamental nas características deste queijo, crescendo em condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas (BRUNO; CARVALHO, 2009). Alguns produtores, porém, utilizam em substituição ao "pingo", a “rala”, que é uma porção do queijo que é ralada e adicionada ao leite no momento da fabricação do queijo como cultura *starter* (FIGUEIREDO, 2014).

A microbiota endógena do “pingo” é a principal responsável pelo grau de maturação do queijo, o que explica os valores mais elevados encontrados nos processos de fabricação que utilizaram essa tecnologia. Esse coeficiente elevado se dá devido à variação observada na extensão da proteólise (SILVA et al., 2011). As bactérias

encontradas são do tipo homofermentativas, produtoras de ácido lático como o principal produto da fermentação da lactose e as heterofermentativas, que produzem além de ácido lático, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil que são compostos flavorizantes, sendo classificadas de acordo com a temperatura de crescimento em mesofílicas (± 30 °C) e termofílicas (± 45 °C) (FOX et al., 2000).

No processo de maturação, estas bactérias láticas que constituem a microbiota dos diferentes tipos de queijos, se dividem em dois grupos de bactérias, um deles vai logo agindo assim que entram em contato com o leite, estas bactérias são conhecidas como bactérias *starter,* neste grupo encontram-se lactobacilos, lactococos e estreptococos que possuem proteinases e peptidases ligadas à membrana celular e são responsáveis pelas primeiras mudanças da maturação de queijos. Algumas destas bactérias estão presentes naturalmente no leite cru (FOX; Mc SWEENEY, 1998; MORENO, 2013). Especificamente esta microbiota inicial é composta por *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc e Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001).

Num segundo momento, as enzimas provenientes de outro grupo de bactérias (microbiota secundária), *non starter lactic acid bacteria* (NSLAB), passam a dominar a microbiota dos queijos até os últimos estágios da maturação. Este grupo é composto por bactérias propiônicas, mofos e leveduras e algumas bactérias contaminantes que sobreviveram ao processo de pasteurização (FOX; Mc SWEENEY, 1998; MORENO, 2013).

Alguns microrganismos deste grupo são proteolíticos, outros são lipolíticos e têm os produtores de gases, específicos para cada variedade ou grupo de queijos e que segundo Chamba e Irlinger (2004), dentre estas BLNI temos como exemplo, leveduras (*Geotrichum candidum*e, *Debaryomyces hansenii*); mofos (*Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*); bactérias (*Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* spp. e lactobacilos heterofermentativos) envolvidos na maturação de queijos. Exceto propionibactéria e lactobacilos heterofermentativos, as culturas secundárias crescem principalmente sobre a superfície de queijos (BERESFORD et al., 2001).

Uma pesquisa desenvolvida com queijos Minas artesanal da Serra da Canastra identificou variação em todos os atributos sensoriais dos queijos analisados, sendo o

"pingo" indicado como o responsável pela caracterização destes perfis sensoriais. O percentual de ácido lático, teor de cloretos e índice de proteólise apresentaram maior coeficiente de variação. Isso se deve provavelmente devido a variações no processo de fabricação ou no processo de salga e devido à diferença na utilização do "pingo", que possui uma grande diversidade em sua microbiota. As tecnologias de fabricação de queijos que utilizaram o "pingo" apresentaram médias mais elevadas no teor de ácido lático, em função da microbiota endógena presente (SILVA et al., 2011).

2.4. Queijo Minas artesanal – aspectos microbiológicos

Os derivados de leite, principalmente os queijos, são alimentos altamente nutritivos, ideais para o crescimento de microrganismos patogênicos como também os microrganismos deteriorantes. *Salmonella, Bacillus cereus, Brucella, Campylobacter, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de toxinfecções alimentares, nos quais leite e produtos lácteos foram envolvidos (HAJDENWURCEL, 2002).

Diversos estudos sobre a qualidade microbiológica dos queijos artesanais (SENA, 2000; ORNELLAS, 2005; BORELLI, 2006; MARTINS, 2006) mostram que os produtos se encontravam em condições higiênicas insatisfatórias (SANTOS, 2010). Entre os microrganismos potencialmente capazes de contaminar esses queijos, destacam-se a *E. coli*, os Estafilococos e suas toxinas, a Salmonela e a *Listeria monocytogenes* (JAY, 2005). De acordo com Sena (2000), os queijos fabricados com leite cru e sem o devido controle higiênico sanitário podem resultar em contaminação microbiana, inclusive por e *S. aureus* e *E. coli*, o que representa perigo à saúde do consumidor.

A qualidade é constituída de variáveis e atributos que podem ser medidos e controlados. Suas características devem atender as necessidades dos consumidores, fornecendo uma relação de satisfação. No entanto, qualidade vai muito além do que é possível se verificar ao simplesmente olhar o produto, uma vez que tal conceito parte do princípio de que é necessário se ter um alimento seguro para seu consumo (CHAVES, 1993).

Segurança alimentar abrange tanto os aspectos quantitativos, como qualitativos. Os quantitativos estão relacionados com a disponibilidade de alimento, e o qualitativo,

visa à saúde do consumidor, principalmente envolvendo todos os elos da cadeia produtiva de alimentos. Trata-se de um conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos visando determinadas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais padronizadas, segundo as quais os alimentos se apresentem adequados ao consumo (GONÇALO, 2006). Assim, caracteriza-se como alimento seguro aquele que não oferece risco à saúde do consumidor, pela presença de perigos de acordo com o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC (ROBBS; CAMPELO, 2002; RESENDE, 2014).

O leite utilizado na fabricação de queijos, em especial do queijo Minas artesanal, deve ser de excelente qualidade e livre de quaisquer perigos sejam eles físicos, químicos ou biológicos, visto que este é utilizado cru, ou seja, sem nenhum processo de tratamento. Como vários trabalhos realizados em queijos artesanais mostraram que os produtos apresentaram condições higiênicas insatisfatórias, é de suma importância atentar para a qualidade dessa matéria prima (ORNELLAS, 2005; BORELLI, 2006; MARTINS, 2006).

No que diz respeito aos perigos biológicos, os produtos que não são fabricados com os cuidados higiênico-sanitários necessários podem representar risco à saúde dos consumidores. Assim, além dos cuidados aplicados à fabricação, o fermento natural endógeno deve ser rico em bactérias láticas e microbiota endógena, o que eleva a segurança do produto final. Outros processos que ajudam no controle da microbiota indesejável são a maturação e a adição de cloreto de sódio (DORES; FERREIRA, 2012).

O primeiro se faz necessário devido às modificações que ocorrem da periferia ao interior do queijo, que são uma combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos e reduzem a alta contagem de microrganismos indesejáveis (MARTINS, 2006; DORES et al., 2013; RESENDE, 2014). O segundo se faz importante por diminuir a atividade de água (Aw) liberando a água livre da massa, formando a casca do queijo e aumentando a vida de prateleira do produto. Ainda direciona o crescimento de microrganismos nos alimentos, já que ele desenvolve a microbiota endógena do queijo e controla aqueles deterioradores e patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2007; RESENDE, 2014).

De acordo com Dores et al. (2013) e Resende (2014), além destes, outros fatores como pH, umidade, temperatura de maturação, potencial de oxirredução (Eh) e atividade de água (Aw) afetam o crescimento microbiano (Quadro 1).

Quadro 1 - Parâmetros que afetam o crescimento microbiano em queijo.

Fatores	Efeito no crescimento microbiano
Umidade	Umidade elevada aumenta susceptibilidade de esporulação
Teor de sal	Inibe geralmente em concentrações de 10 a 100g/kg
pH	Crescimento ótimo próximo da neutralidade. Inibido em pH<5
Temperatura de Maturação	Temperaturas ótimas para crescimento de mesófilos e termófillos são 30 e 42 °C, respectivamente
Eh	Aeróbios estritos (500 a 300 mv); anaeróbios estritos (100 a - 300 mv); anaeróbios facultativos (100 a - 110)
Nitrato	Usado em queijos para prevenir o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum.*

Fonte: Franco; Landgraf (2007).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) podem ser divididas em dois grupos: as intoxicações alimentares e as infecções alimentares. As intoxicações são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, que são produzidas na fase log de desenvolvimento do microrganismo patogênico. Neste grupo destacam-se o *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum, Bacillus cereus* e alguns fungos produtores de micotoxinas. Já as infecções alimentares são caracterizadas pela ingestão de células viáveis do microrganismo patogênico que estão presentes no alimento, ocorrendo a aderência deste à mucosa intestinal e consequente colonização. Esta bactéria pode então ter características invasivas como é o caso da *Salmonela, Shighella*, *Escherichia coli* enterocolítica ou ainda serem toxigênicas incluindo o *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica entre outras (FRANCO; LANDGRAF, 2007; RESENDE, 2014).

Para os queijos artesanais os padrões microbiológicos são exigidos pela legislação estadual, no Decreto nº 44.864, conforme Tabela 1 (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2008).

O cumprimento dos parâmetros microbiológicos para queijos artesanais é importante para que estes não percam o espaço na economia da região, para manter a segurança do alimento, e para preservar todas as características tradicionais deste tipo de queijo (SILVA, 2007; RESENDE 2014).

Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos para queijos Minas artesanais.

Parâmetros microbiológicos	Padrão microbiológico aceitável
Coliformes a 30 °C	n=5; c=2; m=1000; M=5000
Coliformes a 45 °C	n= 5; c=2; m=100; M=500
Estafilococos coagulase positivo	n=5; c=2; m=100; M=1000
Listeria sp.	n=5; c=0; m=0
Salmonella sp.	n=5; c=0; m=0

Em que: n = é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c = é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites m e M; m = é o limite que separa o produto aceitável do inaceitável.
Fonte: Minas Gerais (2002); Minas Gerais (2008).

2.4.1. Coliformes a 30 °C e a 45 °C

Os coliformes são grupos de bactérias indicadoras de contaminação e são formados pelos gêneros *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter* e *Klebsiella*. Tais bactérias habitam o intestino de animais, como o homem, e são largamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas e alimentos, servindo de parâmetro microbiológico básico às leis de consumo criadas pelos governos e empresas fornecedoras que se utilizam desse número para garantir a qualidade do alimento para o consumo humano. Desta forma a utilização de coliformes como indicadores de condições higiênico–sanitárias em alimentos é uma prática comumente estabelecida. As bactérias do grupo coliforme diferenciam-se em totais (30°C) e termotolerantes (45°C) (FRANCO; LANDGRAF, 2007; SILVA et. al., 2007).

O grupo dos coliformes a 30°C inclui todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a temperaturas mesofílicas de 32 °C sendo encontrados em fezes, solos e vegetais (HITCHINS; HARTMAN; TODD, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2007). O índice de coliformes a 30°C é útil para verificar as condições higiênicas empregadas durante o processamento ou ainda contaminações provenientes da matéria prima. As espécies entéricas pertencentes a este gênero estão *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter e Klebsiella,* dentre as não-entéricas estão, por exemplo*, Serratia e Aeromonas* (SILVA et al., 2011).

Os coliformes a 45°C são bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, oxidase-negativas, caracterizadas pela atividade da enzima β-galactosidase. Podem crescer em

meios contendo agentes tenso-ativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44º – 45 ºC, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que não tenham sido contaminados por material fecal. Neste grupo estão a *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes e Citrobacter freundii* (BRASIL, 2005; SILVA et. al., 2007).

Escherichia coli é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento. No grupo das *E. coli* que são comprovadamente patogênicas e causam gastroenterites agudas estão cinco classes de cepas: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica – responsável por diarreia infantil aguda); EIEC (*E.coli* enteroinvasiva – invade as mucosas, causando ulceração e inflamação do intestino grosso); ETEC (*E. coli* enteroxigênica – é agente de diarreias infantis, doenças severas como a cólera e a diarreia dos viajantes); EHEC (*E.coli* entero-hemorrágica) responsáveis por diarreias sanguinolentas e colites) e EAggEC (*E.coli* enteroagregativa – conforme o padrão de aderência das células) (SILVA et. al., 2007; RESENDE, 2014).

2.4.2. Estafilococos coagulase positivo

Bactérias desse gênero podem ser caracterizadas como cocos Gram positivos em grumos (cachos de uva), pertencentes à família Micrococcaceae. São anaeróbias facultativas, mesófilas com ótima a 37 °C, halotolerantes (toleram concentrações de NaCl de 10 a 20%), e crescem na faixa de pH de 4 a 9,8, e Aa mínima é de 0,83 (SILVA et. al., 2007).

Entre as 32 espécies de estafilococos, cinco são capazes de produzir coagulase livre: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* sub. coagulans e *S. delphini*. Destas cinco espécies, três (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar. Além disto, estas três espécies apresentam outras semelhanças, como a capacidade de produzirem a enzima termonuclease. Com relação às outras duas espécies coagulase positiva, não há relato de seu isolamento em alimentos nem de seu envolvimento em casos de intoxicação alimentar (KONEMAM et al., 2001).

O *Staphylococcus aureus*, espécie patogênica mais importante deste grupo, é caracterizada por ser catalase, coagulase e DNAse termoestável positivos e redutores de

telurito, distinguindo-a das demais espécies de *Staphylococcus*. Esta espécie também é responsável pelas pré-formação de enterotoxinas que não alteram significativamente cor, aroma e sabor de produtos. Enterotoxinas são proteínas de baixa massa molecular onde suas cadeias polipeptídicas são ricas em lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina. Existem cerca de 18 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (EE) as quais podem ser diferenciadas por meio de sorologia, e estas se mostraram termoestáveis, resistentes a ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo e hidrossolúveis (OMOE et al., 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2007; RESENDE, 2014).

As enterotoxinas são pré-formadas de quatro a seis horas quando encontram condições de temperatura (não são produzidas abaixo de 10 ºC), atividade de água, pH e oxigênio e quando presentes em populações maiores que 10^5 UFC/mL ou g (FRANCO; LANDGRAF, 2007). Na Tabela 2 estão presentes alguns fatores que podem afetar a produção de enterotoxina em alimentos.

Tabela 2 - Fatores que afetam a produção de enterotoxina em alimentos.

Fatores	Produção de enterotoxina
Temperatura	10 °C a 45 °C (ótimo a 37 °C)
pH	5,2 a 9,0 (ótimo a 6,5 a 7,5)
Atividade de água	> 0,90 (ótimo a 0,99)
Condições atmosféricas	Condições aeróbicas e anaeróbicas
Microbiota concorrente	Geralmente só há produção de enterotoxina quando a contaminação inicial for elevada

Fonte: Franco e Landgraf (2007).

Uma dose de toxina menor que 1,0 µg/kg em alimentos contaminados produzirão sintomas de intoxicação por estafilococos. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas sendo os principais sintomas náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e sudorese. Quando há choque, ocorre a desidratação devido ao excesso de vômito sendo necessária a ingestão intravenosa de eletrólitos (OMOE et al., 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2007; RESENDE, 2014).

O ser humano e os animais são os principais reservatórios deste micro- organismo. A cavidade nasal é o principal habitat sendo dali transferidos para outros locais por meio

das mãos, sendo estas importantes fontes de contaminação dos alimentos. Nos animais podem estar associados a casos de mastite bovina e o controle desta se faz necessário principalmente quando este é utilizado para a fabricação de produtos de leite cru (RESENDE, 2014).

A capacidade de crescer em diferentes condições ambientais e nutricionais fazem com que o *S. aureus* se desenvolva em vários alimentos, principalmente aqueles submetidos à extensa manipulação e mantidos a temperatura ambiente por longos períodos. O queijo Minas artesanal além do agravante de ser muito manipulado é feito com leite cru o que propicia a presença deste micro-organismo o que já foi verificado por vários estudos (PINTO et al., 2004; MARTINS, 2006; DORES, 2013).

2.4.3. *Listeria* sp.

Bactérias desse gênero podem ser caracterizadas bastonetes gram-positivo curto com extremidades arredondadas e móvel a temperatura entre 20 °C e 25 ºC, anaeróbio facultativo, psicrotrófica com temperatura ótima de crescimento a 37 °C, suportando vários congelamentos e descongelamentos, classificados assim como psicrotolerantes. Não esporulado e acapsulado, este microrganismo é capaz de tolerar alterações de pH entre 4,3 a 9,6 e altas concentrações de NaCl (até 30% dependendo da temperatura), atividade de água ótima é de 0,97 contudo pode crescer a 0,92 (FRANCO; LANDGRAF, 2007; SILVA et. al., 2007; RESENDE, 2014).

O gênero Listeria compreende em seis espécies principais sendo elas: *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. innocua, L.welshimeri*e *L. grayi* (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). Das espécies de Listeria, *L. monocytogenes* é o principal patógeno para o homem. A natureza ubiquitária, psicrófila, microaerófila e grande resistência a adversidades diferem esta espécie de muitos patógenos alimentares.

A listeriose caracteriza-se por um quadro de alta severidade (meningite, septicemia, aborto) e natureza não entérica, havendo predileção por indivíduos imunodeprimidos, idosos, neonatos e gestantes. Possui período de incubação de 3 a 70 dias dificultando a descoberta do agente causador da listeriose, contudo a mesma é sensível aos processamentos térmicos, como é o caso da pasteurização (ROCOURT et al, 2003).

Amplamente distribuída pelo ambiente, principalmente em solo e vegetais, e por isso é facilmente encontrada em alimentos de origem vegetal e animal "in natura" como é

o caso do queijo Minas artesanal. Para tanto, pela legislação brasileira a exigência é de que a Listeria esteja ausente em 25g de amostra (RESENDE, 2014).

2.4.4. *Salmonella* sp.

Salmonella é caracterizada como pequenos bacilos gram negativos, não esporogênico, anaeróbios facultativas, catalase positiva, oxidase negativa, e em geral são móveis. O pH para crescimento pode ser entre 4 e 9 com ótimo de crescimento próximo da neutralidade enquanto a temperatura de crescimento ótima é de 36 °C podendo crescer de 7 °C a 47 °C e Aa mínima de 0,94 (FRANCO; LANDGRAF, 2007; SILVA et. al., 2011; RESENDE, 2014).

Dentre as principais doenças causadas pela Salmonella estão a febre tifoide, causada por *Salmonella typhi*, febre entérica, causada por *Salmonella paratyphie,* as salmoneloses causadas pelas demais espécies desta bactéria. Diarreia, dores abdominais e vômitos após 12 a 36 horas de contato com o micro-organismo são os principais sintomas relatados sendo que estes podem permanecer por até quatro dias (FRANCO; LANDGRAF, 2007; SILVA et al., 2011; RESENDE, 2014). Para tanto, pela legislação brasileira a exigência é de que a Salmonela esteja ausente em 25 g de amostra (BRASIL, 2003).

2.5. Aspectos microbiológicos x segurança dos queijos Minas artesanais

Embora o queijo Minas artesanal seja um patrimônio do Estado e tradicional em várias regiões, por ser um produto totalmente artesanal, a sua inocuidade não pode ser totalmente assegurada, sem antes atender a uma série de precauções. A utilização do leite cru para a produção sem o rigor sanitário é o principal fator que pode representar um risco à saúde pública. Desta forma, quando há procedimentos que apresentam ausência das boas práticas, nas etapas do processamento do queijo artesanal está sujeito a muitas fontes de contaminação, comprometendo diretamente a sua qualidade e afetando a saúde do consumidor (PINTO et al., 2009; RESENDE, 2014).

Dentre as fontes de contaminação podem-se citar a sanidade inadequada do rebanho, visto que o leite pode conter várias espécies de bactérias sendo que muitas são patogênicas, o ordenhador, que pode ser portador assintomático de algumas delas, os equipamentos e utensílios de ordenha por serem passíveis de incrustações e formação de

biofilmes, e a água utilizada que pode não receber tratamento adequado. Além disso, na maioria das vezes, o tempo de maturação não é respeitado pelo produtor, visto que esta é a fonte de renda do mesmo e, como consequências, existe a possibilidade de ser colocado no mercado um produto de qualidade insatisfatória (PINTO et al., 2009; RESENDE, 2014).

O curto período de maturação pode oferecer risco ao consumidor devido a possível presença de bactérias patogênicas que são então dependentes de fatores como a combinação tempo/temperatura, a umidade e o teor de sal dos queijos, para a sobrevivência e multiplicação dos patógenos (BACHMANN et al., 2011). A maturação em temperatura ambiente leva a fermentação desejável que ocorre pelas bactérias láticas. Quando o queijo é resfriado antes da maturação ocorre inibição das bactérias desejáveis, propiciando o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, possivelmente presentes no leite cru (MARTINS, 2006; DORES, 2013; RESENDE, 2014).

O período mínimo necessário de maturação do queijo Minas artesanal da Canastra para atingir os limites previstos na legislação e atingir a inocuidade foi definido em função da maior resistência encontrada pelo *S. aureus.* Este patógeno estava presente após 64 dias de maturação controlada a 10 °C e estimou-se que 84 dias seriam necessários para redução aos níveis aceitáveis (DORES, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados no Serro por Martins et al. (2015) que realizaram estudos em queijos Minas artesanal fabricados nas regiões do Serro, indicando que a maturação à temperatura ambiente conseguia reduzir a níveis aceitáveis a contagem microbiológica nos queijos, em um tempo relativamente menor, e ao mesmo tempo manteve a aparência e características de sabor do queijo tradicional.

Nesse estudo ainda foi observado que 17 dias era o tempo mínimo de cura à temperatura ambiente para reduzir a limites de segurança para coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em ambos os períodos de fabricação (estação seca e período chuvoso). Sob refrigeração, o tempo mínimo de maturação foi de 33 dias na estação seca e 63 dias na estação chuvosa.

3. REFERÊNCIAS

ALAIS, C. **Ciencia de la leche**. Principios de Técnica Lechera, Traducion de Don Antonio Lacasa Godina. Barcelona, España: Reverté, 2003.

ARAÚJO, J.M.A., **Química de alimentos: teoria e prática.** 5. ed. Viçosa: UFV, 2011.

BANK, J.M. Cheese. *In*: EARLY, R. (ed.). **The Technology of Dairy Products**. 2.ed. Cap.3, p.81-122,1998.

BARROSO, M.C; GONÇALVES, E.A.; BARBOSA, M.A. **Caracterização da Região do Serro como produtora de queijo Minas artesanal.** Emater, 2002.

BECH, A.M. Characterizing Ripening in UF-cheese. **International Dairy Journal**, v.3, p.329-342, 1993.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259–274, 2001.

BORELLI, B.M. Enteroxigenc *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants durind production of Canastra cheese, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.37 p. 545-550, 2006.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n°146, de 6 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Resolução nº. 375, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 30 de agosto de 2013. Delegada ao órgão estadual e/ou municipal de inspeção, reconhecido pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal – SISBI/POA, a definição de novo período de maturação dos queijos artesanais, após a avaliação de estudos técnico-científicos**. Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de agosto de 2013.

CHAMBA, J.F.; IRLINGER, F. Secondary and Adjunct Cultures. *In*: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. (ed.). **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology.** San Diego, California: Elsevier, 2004. 3. ed. Cap. 9, p. 191-206.

CHAVES, J.B.P. **Monitoramento da qualidade**. EPAMIG/CEPE/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 151 p. 1993.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 841-866, 2003.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. Lipolysis and Catabolism of Fatty Acids in Cheese. *In*: FOX, P.F. *et al*. (ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Elsevierl, 2004. v.1, p. 373-385.

COSTA JÚNIOR, L.C.G.; MORENO, V.J.; MAGALHÃES, F.A.R.; COSTA, R.G.B.; RESENDE, E.C.; CARVALHO, K.B.A. Maturação do queijo minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.

DIAS, B.F.; FERREIRA, S.M.; CARVALHO, V.S.; SOARES, D.S.B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo Minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-ms, v. 3, n. 3, p.57-64, 2016.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K.; BERTOLINO, M.; COCOLIN, L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese**. International journal of food microbiology**, v. 143, n. 1, p. 71-75, 2010.

DORES, M.T. **Queijos artesanais da** Canastra **maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DORES, M.T.; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.2, p.26-34, 2012.

ECK, A. **O queijo**. Portugal: Publicações Europa-América, 1987. v. 1. (Coleção EUROAGRO).

EMATER/MG. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. **Revista da EMATER**, v. 22, n.80, p.8-9, 2004.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Mapa do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte, 2015. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br. Acesso em: 10 Set. 2017.

FERREIRA, E.G**. Caracterização microscópica e microbiológica do biofilme dos utensílios de madeira utilizados na fabricação de queijo Minas artesanal das regiões do Serro e Canastra.** 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

FIGUEIREDO, S.P. **Características do leite cru e do queijo minas artesanal produzidos na região do Serro, Minas Gerais e, produção de queijos com doces.** 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

FIGUEIREDO, FOX, P.F.; GUINEE, T.O.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *In*: FOX, P. F. (ed.). **Cheese:** chemistry, physics and microbiology, London: Chapman & Hall, v.1, 1997. p. 389-439.

FOX, P.F.; GUINEE, T.O.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science.** Maryland: AN ASPEN PUBLICATION, 2000. 638p.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Chemistry and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks. *In*: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. (ed.). **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. cap.10. p. 403–418.

FRANCO, B. D. G de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2007.

GONÇALO, E. **Panorama da segurança de alimentos no Brasil e no mundo**. 2006. Disponível em: http://www.cic.org.br/uploads/Rac/Seguran%C3%A7a_Alimentar_no_Brasil_e_no_Mundo.pdf . Acesso em: 16 jan. 2017.

HAJDENWURCEL, J.R. Produção segura na cadeia alimentar do leite. *In*: PORTUGAL, J.A. B. *et al*. (ed.). **Segurança alimentar na cadeia do leite.** Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora Ltda. 2002. p.99–112.

HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins.** 3.ed. Washington: American Public HealthAssociation, 1996. p. 325-369.

IEPHA-MG. INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. Decreto nº 42. 505, de 15 de abril de 2002. Registro de bens culturais de natureza imaterial ou intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais. Diário Oficial do Município, Belo Horizonte, 2002.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 517, de 14 junho de 2002.** Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002a.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 518, de 14 junho de 2002.** Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002b.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 523, de 03 julho de 2002.** Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002c.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 546, de 29 de outubro de 2002.** Dispõe sobre a identificação microrregião do Serro. Belo Horizonte, 2002d.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 591, de 26 de maio de 2003.** Inclui município na microrregião do Serro. Belo Horizonte, 2003.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/ certificação/queijo- minas-artesanal-link. Acesso em: 18 abr. 2017.

ITAL. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Brasil dairy trends 2020.** Tendências do mercado de produtos lácteos. Queijos, requeijão e produtos relacionados. Campinas, SP. 1. ed. ISBN: 978-85-7029-143-1. Disponível em: http://www.brasildairytrends.com.br/26/. Acesso em: 04 ago. 2020.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. *In*: KONEMAM, E. W. *et al*. (ed.). **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

LOURENÇO NETO, J.P.M.L. **Queijos – Aspectos Tecnológicos**. 1. ed. 2013. 270 p.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro.** 2006. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL FILHO, N. J. RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time at room temperature and under refrigeration of Minas artisanal cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUSA M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: a review. **Lait, Les Ulis**, v. 80, p. 293-324, 2000.

McSWEENEY, P. L.H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology,** v. 57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002.** Aprova o regulamento da lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 2002.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 818, de 12 dezembro de 2006.** Dispõe sobre regulamento técnico de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, 2006.

MINAS GERAIS. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Decreto nº 44.864.** Altera o regulamento da lei n° 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 01 de agosto de 2008.

MINAS GERAIS. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Lei n° 19.492 de 13 de Janeiro de 2011**. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, 13 de janeiro de 2011.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária, IMA. **Portaria nº 1.305**. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 30 de abril de 2013.

MINAS GERAIS. **Legislação estadual nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012.** Dispõe sobre o processo de produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=248559. Acesso em 29 abr. 2016.

MINAS GERAIS. **Legislação estadual nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018.** Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Disponível em: https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018 . Acesso em 16 jul. 2020.

MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F.; COSTA, G. A. N.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SILVA, A. T.; DESTRO, M. T. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.57, n.327, 2002.

MORENO, V. J. **Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes**. 2013, 131f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Laticínios) – Universidade Federal de Juiz de Fora , Juiz de Fora, 2013.

MUNDO DO LEITE. Produção, Industrialização e Consumo. Revista Mundo do Leite. n° 04. Maio, 2003.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L.M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.23, p. 177-182, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos**. Alimentos de origem animal. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios Básicos de Fabricação de Queijos: do histórico a salga. **Revista do Instituto de Laticínios "Candido Tostes"**. Juiz de fora, v.64, n.367-368, p.19-25, 2009.

PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A.Substitution of natural whey starter by mixed strains of Lactobacillus helvéticus in the production of Reggianito Argenito Cheese. **International Journal of Dairy Technology,** Huntingdon, v.57, n.01, p. 45-51, 2004.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 02, p. 293-300, 2004.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal do Serro**. 2004. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

RESENDE, E.C. **Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo minas artesanal da microrregião campo das vertentes**. 2014. 114f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

ROBBS, P. G.; CAMPELO, J. C. F. **Produção segura na cadeia alimentar do leite**. *In*: PORTUGAL, J. A. B. (ed.). Segurança alimentar na cadeia do leite. Juiz de Fora: Juiz de Fora: Epamig/ILCT; Embrapa gado de leite, p. 51-76. 2002.

ROCOURT, J.; BEN EMBAREK, P.; TOYOUFUKU, H.; SCHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat: the FAO/WHO approach. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, n. 3, p.263-267, 2003.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). 3.ed. ***Listeria*, listeriosis and food safety.** Boca Raton: CRC Press, Chap. 1, p.1-20. 2007.

SANTOS, A. S. **Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijo coalho comercializado em Recife – PE.** 2000. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SIHUFE, G.A.; ZORRILLA, S.E.; SABBAG, S.C.; COSTA, S.C.; RUBIOLO, A. The influence of ripening temperature on the sensor characteristics of Reggianitoargentino cheese**. Journal of Sensory Studies**, v.25, n.1, p.94-107, 2010.

SILVA, J.G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras. Lavras, 198p. 2007.

SILVA, J.G.; ABREU, L.R.; MAGALHÃES, F.A.R.; PICCOLI, R.H.; FERREIRA, E.B. **Características físico-químicas do queijo minas artesanal da Canastra**. Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes, v.66, n. 380, p.16-22, 2011.

SILVA, L. A. **Desenvolvimento e avaliação sensorial de queijos minas frescal temperados processados no laticínio cooperbelgo.** 2015. Trabalho de conclusão de curso (Química Industrial) - Universidade estadual de Goiás, Anápolis, 2015.

SPERAT-CZAR, A. **Os queijos de leite cru.** Sertãobras, 2012. 75 p.

UPADHYAY, V.K.; McSWEENEY, P.L.H.; MAGBOUL, A.A.A.; FOX, P.F. **Proteolysis in Cheese during Ripening.** v.1, 2004. p. 391-434.

VENEMA, D. P.; HERSTEL, H.; ELENBAAS, H. L. Determination of the ripening time of Edan and Gouda cheese by chemical analysis. **Netherlands Milk and Dairy Journal,** Amsterdam, v.41, p.215-226, 1987.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 1, p. 329-350, 1993.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F., LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em Queijo Minas Frescal**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 44, p. 50-54, 1989.

CAPÍTULO 5 - PERSPECTIVAS DO DESENVOLVIMENTO DE HAMBÚRGUERES MAIS SAUDÁVEIS REDUZINDO SÓDIO E ADICIONANDO AROMATIZANTES E LINHAÇA

Letícia Costa Amorim da Trindade
Frederico Souzalima Caldoncelli Franco
Augusto Aloísio Benevenuto Júnior
Vanessa Riani Olmi Silva

1. INTRODUÇÃO

Fatores relacionados ao estilo de vida e alimentação podem promover diversos problemas de saúde como as doenças crônicas não transmissíveis, entre elas a hipertensão e doenças cardiovasculares, que são as principais causas de morte no Brasil (BRASIL, 2012a). Mudanças na alimentação causadas pelo estilo de vida contemporâneo têm sido o principal motivo da redução do consumo de frutas e hortaliças. Em contrapartida, observa-se um aumento no consumo de alimentos de fácil preparo e consumo, normalmente ricos em sódio (ARAUJO et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo máximo de 2g/dia de sódio, pois sua ingestão excessiva é a principal causa do aumento da pressão arterial (COXSON et al., 2013). Diante dessa situação, o Plano de Combate às Doenças Crônicas Não Transmissíveis (PCNCD) foi criado com o intuito de promover metas e ações para a melhoria da qualidade nutricional da população, por meio da redução de sódio e reformulação em produtos alimentícios processados (MALTA; NETO; JUNIOR, 2011; BRASIL, 2013).

Produtos cárneos estão entre os alimentos processados mais consumidos e geralmente são produtos ricos em sódio, como o caso dos hambúrgueres, um alimento apreciado por todas as classes sociais (LILIC et al., 2015), sendo então necessária sua alteração para o cumprimento do PCNCD e melhoria nutricional dos alimentos ofertados aos consumidores. Assim a redução de sódio se tornou um desafio para a indústria, uma vez que é um dos responsáveis pelas propriedades sensoriais e tecnológicas dos produtos cárneos.

A redução de sódio em produtos cárneos pode afetar negativamente a aceitação sensorial por parte dos consumidores, sendo sugerida a adição de ingredientes que reforcem a percepção do sabor salgado (BREWER, 2012; TOBIN et al., 2013). Os aromatizantes são substâncias que não tem em si um sabor salgado, mas podem

aumentar a percepção da salinidade quando associados ao cloreto de sódio e compensar a redução de sal em produtos cárneos (FELLENDORF; O'SULLIVAN; KERRY, 2016).

Visando a oferta de alimentos mais saudáveis, uma estratégia para o desenvolvimento de produtos cárneos mais saudáveis é a utilização de outros ingredientes, como a linhaça. Esta é uma alternativa para melhorar a qualidade tecnológica e nutricional, uma vez que a linhaça é fonte de ácidos graxos α-linolênico (LNA) e linoléico (LA), precursores de outros ácidos graxos das séries ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6)(SCHMIELE et al., 2015; TALUKDER, 2015).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Mudança de hábitos alimentares

A alimentação faz parte do comportamento humano, e possui vários fatores que consciente ou não, influenciam a ingestão alimentar, interferindo nas escolhas e hábitos cotidianos. O comportamento alimentar pode ser, então, caracterizado pelas relações entre as práticas alimentares de grupos humanos, de forma individual e coletiva (MALTA; NETO; JUNIOR, 2011; UFMA, 2014).

A alimentação se desenvolve em função do consumo de alimento, considerando o sabor, cor, forma, aroma e textura na abordagem nutricional. Os nutrientes dos alimentos são importantes, porém não são os únicos fatores que interferem no consumo alimentar. O alimento pode oferecer significados culturais, comportamentais, afetivos e ser uma fonte de prazer. Por outro lado, o estado nutricional e o consumo alimentar interagem em conjunto podendo ocasionar ou não, fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis. Uma boa alimentação, portanto, depende do equilíbrio entre a quantidade e qualidade dos alimentos, onde cada nutriente possui sua função no organismo, e que a falta ou excesso de um nutriente podem causar transtornos (UFMA, 2014).

Alterações do comportamento alimentar são diretamente relacionadas ao estilo de vida. Anteriormente, as refeições eram preparadas em casa com um perfil mais saudável e servida em horários determinados, com toda a família à mesa. Atualmente, estas refeições têm sido substituídas por refeições rápidas, realizadas fora de casa e sem regularidade nos horários (SAVAGE; FISHER, 2007). O consumo de frutas e hortaliças diminuiu segundo o recomendado pelo Guia Alimentar para a População Brasileira,

enquanto aumentou a ingestão de alimentos processados e minimamente processados (BRASIL, 2012b; ARAUJO et al., 2013).

Entre os alimentos processados mais consumidos estão macarrão instantâneo, salsichas, hambúrgueres e alimentos empanados. Isso se deve a fácil acessibilidade, rápida preparação e ao sabor atraente para a maioria dos consumidores, sendo utilizados em substituição ou junto com as refeições principais (RIBEIRO et al., 2013).

Alimentos processados possuem modificações do seu estado original, por meio de uma variedade de possíveis processamentos com diferentes finalidades. Além disso, podem ser utilizadas substâncias extraídas de alimentos (óleos, gordura, açúcar, proteínas), derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, amido modificado, etc.) ou sintetizadas em laboratório com base em matéria orgânicas como: corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e outros aditivos usados para alterar propriedades sensoriais (MOODIE et al., 2013; MOUBARAC et al., 2014).

Embora o alimento processado mantenha a identidade básica e a maioria dos nutrientes do alimento ao qual é derivado, os ingredientes e os métodos de processamento utilizados na fabricação podem alterar desfavoravelmente a composição nutricional. A adição de sal ou açúcar e a perda de água elevam a concentração de calorias e nutrientes do alimento original, em que o consumo excessivo tem sido associado a doenças crônicas não transmissíveis, principalmente doenças cardíacas e obesidade (BRASIL, 2014).

O aumento de doenças crônicas está diretamente relacionado ao acelerado processo de urbanização, ao aumento progressivo da expectativa de vida, do sedentarismo e das mudanças no padrão alimentar da população. Esses fatores além de constituírem a principal causa de morte entre os adultos, representam a maior parte das despesas com assistência ambulatorial e hospitalar no país (BRASIL, 2012a).

A alimentação inadequada é uma das principais causas da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis nos últimos anos, sendo a ausência de hábitos saudáveis a justificativa para a prevalência de sobrepeso, obesidade e do aumento de risco para doenças crônico-degenerativas (CORRÊA; DE ALMEIDA, 2017), devido ao consumo de alimentos pobres em vitaminas, sais minerais, proteínas e fibras, substituídos por alimentação rica em gorduras, açúcares e sódio (MEDEIROS; GALENO, 2013).

Coxson et al. (2013) demonstraram os efeitos benéficos da diminuição do consumo de sódio para a redução dos níveis de mortalidade em decorrência de hipertensão e efeitos do consumo de gorduras saturadas. Dentre as doenças provenientes de consumo excessivo de alimentos com elevados teores de gorduras saturadas e sódio citam-se: hipertensão (aumento da pressão arterial), obesidade (excesso de peso) e dislipidemia (anomalias nos níveis de lipídeos sanguíneos). A OMS também alertou que alimentos com elevados conteúdos de ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e sódio, quando consumidos periodicamente podem contribuir para o surgimento de doenças (WHO, 2003).

2.2. Sódio na dieta

Segundo Nilson, Spaniol e Gonçalves (2016), o sódio é o principal cátion do fluido extracelular e um dos principais minerais do plasma sanguíneo. Entre suas funções no organismo humano, a principal consiste na modulação e permuta de líquidos entre os vários órgãos, permitindo uma troca constante e bem regulada dos nutrientes e dos produtos de desgaste entre a célula e o seu meio externo. Esse é o motivo que torna o sódio essencial à manutenção da pressão osmótica do sangue, plasma e fluídos. Todavia, a inadequação alimentar com consumo de altos teores de sódio tem sido associada à principal causa do surgimento da hipertensão arterial, que é considerado um problema de saúde pública mundialmente (CRUZ et al., 2011; COXSON et al., 2013; IGNÁCIO et al., 2013).

A hipertensão arterial é caracterizada por níveis pressóricos elevados, sendo diagnosticada com valores iguais ou superiores a 140/90 mmHg, identificados em duas ou mais aferições (MOURA; NOGUEIRA, 2013; INGUGLIA et al., 2017). Estima-se que a hipertensão arterial atinge 20 a 25% da população mundial e que no Brasil aproximadamente 17 milhões de indivíduos sejam portadores, constituindo um sério fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, caracterizando-se como importante problema de saúde pública (INGUGLIA et al., 2017). Além do mais, a hipertensão é causa de 40% das mortes por acidente vascular encefálico (AVE) e 25% por doença arterial coronariana no país, sendo apontada como a quinta causa de óbito no mundo (BRASIL, 2012a; LIMA et al., 2016).

A literatura recente demonstra que o consumo de sal na maioria dos países tem variado entre 9 a 12g dia por pessoa. Contudo, a OMS recomenda uma ingestão diária para adultos não hipertensos de no máximo 5g de sal (equivalente a 2g de sódio) e 1g de sal para aqueles acometidos de hipertensão. Em crianças e adolescentes, a ingestão de baixos teores de sódio é associada à melhoria da saúde cardíaca na vida adulta (COXSON et al., 2013).

O crescente consumo de alimentos processados associados à adição de sal durante o cozimento e à mesa são as principais causas da ingestão excessiva de sódio pela população brasileira (SARNO et al., 2009; BRASIL, 2014). Entretanto, a ingestão excessiva de sódio é mencionada acarretar diversos problemas de saúde (COXSON et al., 2013; INGUGLIA et al., 2017), pois o sódio presente no sal de cozinha (NaCl), convencionalmente adicionado aos alimentos tem grande importância para o sabor dos produtos industrializados, conferindo a salinidade, especialmente para os produtos cárneos (OLIVEIRA et al., 2013), e assim, não podendo ser eliminado em sua totalidade.

2.3. Redução de sódio em alimentos

Os consumidores estão cada vez mais atentos à composição dos alimentos aumentando sua atenção à saúde e quanto ao consumo de carnes processadas (TOBIN et al., 2013). Esse fato pode ser explicado pelo aumento da divulgação em diversos meios de comunicação dos efeitos negativos do consumo excessivo de alimentos ricos em gordura e sal, para a saúde do consumidor (BRITTON et al., 2013).

Em contrapartida, iniciativas de redução de sódio em alimentos parecer ser promovida por diversos países (DESMOND, 2006; COXSON et al., 2013), onde o principal foco desta política tem centrado nos produtos cárneos. No Brasil, o Ministério da Saúde apresentou um Plano de Combate às Doenças Crônicas Não Transmissíveis, que inclui ações para promover dietas saudáveis e reduzir o consumo de sal de 12g para 5g até 2022 (MALTA; NETO; JUNIOR, 2011; BRASIL, 2013). Ao estabelecer metas bianuais, esse plano propõe uma redução gradual e voluntária dos teores de sódio, considerando os aspectos de desenvolvimento e as alterações de formulações, tecnologias e a adaptação sensorial dos consumidores às mudanças. As metas estabelecidas para a redução de sódio em hambúrgueres foram 780mg de sódio/100g para ser alcançada até 2015 e 740mg de sódio até 2017 (BRASIL, 2013).

Devido à adoção de hábitos alimentares mais adequados pelos consumidores, a demanda por produtos mais saudáveis e as metas estabelecidas, fazem com que as indústrias inovem, modifiquem ou desenvolvam produtos especiais, que promovam a saúde e satisfaça os anseios sensoriais do consumidor (GARMUS et al., 2016).

A maioria das inovações realizadas no processamento de carnes se concentram na reformulação dos produtos por alimentos mais saudáveis, alterando a qualidade nutricional e reduzindo os efeitos maléficos do seu consumo, uma vez que, a carne processada pode contribuir de forma significativa para a ingestão de sal e gordura. Essa redução altera não somente a qualidade nutricional, mas pode trazer alterações nas propriedades tecnológicas, como no perfil de textura e presença de líquido exsudado, além das alterações nas propriedades sensoriais (WEISS et al., 2010).

Neste contexto, o grande desafio da indústria cárnea é o desenvolvimento de produtos que satisfaçam sensorialmente a expectativa dos consumidores e que ao mesmo tempo, possam ser ingeridos sem que causem prejuízos à saúde (BOLGER; LYNG; MONAHAH, 2017).

O sal possui grande importância nos produtos cárneos devido a propriedade conservante, capacidade de alterar o sabor e capacidade funcional de solubilização de proteínas miofibrilares, que são responsáveis pelo auxílio da adesão e coesão de produtos cárneos (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). O sódio solubiliza as proteínas da carne que possuem papel importante, aumentando a hidratação e a capacidade de retenção de água, formação de gel e a emulsificação, com consequente aumento do rendimento após o cozimento e suculência (DESMOND, 2006). Reduzindo o sal, juntamente com a salinidade, haverá mudanças na textura do produto e intensidade do sabor, afetando a aceitação sensorial (BREWER, 2012; TOBIN et al., 2013).

Diversas estratégias são usadas para reduzir sódio nos alimentos processados. Um dos métodos é a redução realizada com base na avaliação sensorial e na aceitação dos produtos, seja com substituição completa ou parcial de NaCl (FELLENDORF; O'SULLIVAN; KERRY, 2016), podendo realizar a substituição com mistura de baixo teor de sódio (PAULSEN et al., 2014) e utilização aromatizantes (SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2020). Silva et al. (2020) e Pires (2016) desenvolveram hambúrgueres com redução de sódio e adição de aromatizantes associados à substituição do NaCl por KCl. Os autores encontram boa aceitação sensorial para os novos produtos, bem como a

manutenção das características físicas e quimicas dos hambúrgueres, sugerindo ser viável o desenvolvimento dessa linha de estudos.

2.4. Aromatizantes

Alguns estudos têm sido realizados para encontrar alternativas para a redução do NaCl nos alimentos e a diminuição dos impactos causados por essa modificação (TOBIN et al., 2013; FELLENDORF; O'SULLIVAN; KERRY, 2016; INGUGLIA et al., 2017). Uma das alternativas é a adição de aromas que contribuam com o aspecto sensorial do produto (CAMPOS; FONTES; CAETANO, 2015; SILVA et al., 2020).

De acordo com o fabricante Corbion PuraQ (PROSPECTOR®, 2019), o aromatizante PuraQ® Arome NA4 é um ingrediente natural, que possui como propriedade a semelhança com o flavor da carne, contribuindo com o sabor picante e salgado. Além disso, ele pode ser caracterizado como aromatizante natural, o que é um benefício para o mercado consumidor que busca produtos mais saudáveis e naturais.

Outro ingrediente que pode ser utilizado para reduzir os efeitos da redução parcial do NaCl dos alimentos é o Aroma de Carne fabricado pela International Flavors & Fragrances (IFF), que contribui para a melhora do sabor e aroma do produto, por ser a base do sal leve, composto de sal hipossódico, um aroma idêntico ao aroma natural da carne, goma arábica e sais dissódicos (CAMPOS; FONTES; CAETANO, 2015).

Pires (2016) utilizou aromatizantes no teste com maior redução de sódio em hambúrguer e observou uma melhora no atributo aroma para a adição de aromatizantes, sugerindo ser uma estratégia viável para o desenvolvimento de hambúrgueres com redução de sódio.

2.5. Linhaça na nutrição

No desenvolvimento de produtos cárneos mais saudáveis, além da utilização da redução dos teores de sódio, novos ingredientes podem ser adicionados para agregar valor nutricional ao produto. A substituição da gordura saturada por lipídios contendo óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) n-3 podem atender a demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis (AYERZA e COATES, 2005). Sendo assim, a linhaça sinaliza ser uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional e tecnológica em produtos cárneos, pois conforme Navas-Carretero et al. (2015), no contexto de uma

dieta equilibrada, a adição de PUFA n-3 a produtos cárneos melhora seu perfil nutricional, sendo um ótima estratégia para o controle de peso corporal dos indivíduos.

A linhaça (*Linum usitatissimum L.*), planta nativa do oeste Asiático e Mediterrâneo, atua como antioxidante biológico e possui aminoácidos que podem ser comparados à da proteína de soja, uma das mais nutritivas do reino vegetal (CASTRO; LELIS, 2011). É um grão que pode ser consumido *in natura*, inteiro ou moído, e acrescentado diretamente em alimentos tais como frutas, leite ou iogurte. Também pode ser utilizado como ingrediente na preparação de bolos, pães, biscoitos, feijão, barras de cereal e produtos cárneos (MARQUES, 2008).

A linhaça é um alimento rico em fibras alimentares e tem sido adicionada a diversos produtos cárneos devido as suas propriedades funcionais e tecnológicas com a finalidade de gerar alimentos acessíveis e saudáveis ao consumidor (WEISS et al., 2010; SCHMIELE et al., 2015; TALUKDER, 2015). Além disso, essa adição de fibras alimentares ajuda a modificar as características tecnológicas e sensoriais gerais, tais como capacidade de retenção de água (CRA), capacidade de retenção de gordura (CRO) e perfil de textura (PETRACCI et al., 2013).

A fibra é um ingrediente alimentar não digerível que inclui polissacarídeos não amiláceos, oligossacarídeos ou lignina, apresentando um bom desempenho no aumento do rendimento de produto cozido e na capacidade de retenção da água, resultando na redução do custo de produção (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012). Diante disto, a aplicação de fibras alimentares em produtos cárneos tem sido estudada por ser uma alternativa de ingrediente mais saudável, além de benefícios tecnológicos. Chaves et al. (2018) utilizaram farinha mista de aveia, chia e linhaça na elaboração de hambúrgueres e encontraram resultados favoráveis para sabor, textura e rendimento quando comparado aos resultados da formulação controle.

A linhaça também exibe propriedades interessantes em seu perfil lipídico, principalmente em razão de sua diversidade de cultivares. Barroso et al. (2014) observaram que o óleo de linhaça marrom apresentou melhor qualidade do que o óleo de linhaça dourada, por verificar que a linhaça marrom possui maiores teores de ácido esteárico (C18:0) e tocoferóis, maior capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa em relação a linhaça dourada. Segundo Novello e Pollonio (2013), a utilização de linhaça em produtos cárneos é uma alternativa tecnologicamente viável, pois em seus estudos

identificaram características físico-químicas aceitáveis, perfil de ácidos graxos n-3 modificados, aumentando a razão PUFA/ácidos graxos saturados (SFA) e reduzindo a razão n-6/n-3, resultando em valores mais próximos das recomendações. No entanto, ainda existem poucos estudos que relatam o desenvolvimento de produtos à base de carne enriquecidos com ácidos graxos n-3 (DELGADO-PANDO et al., 2012).

Apesar do benefício da adição de PUFA a produtos cárneos, a maior suscetibilidade de seus lipídeos à oxidação influencia o tempo de vida útil dos produtos (TRIKI et al., 2013). Além do mais, essa adição pode alterar as propriedades sensoriais, já que a redução de gordura pode modificar os atributos sabor, textura e suculência do alimento (JUÁREZ et al., 2012), o que merece mais investigações.

Os produtos cárneos processados oferecem excelentes estratégias na ingestão de ingredientes funcionais, como a linhaça, por ser comumente consumidos e pouco alterar os hábitos alimentares (NOVELLO; POLLONIO, 2014). Nesta perspectiva, Novello (2011) concluiu em pesquisa sobre a utilização de linhaça em produto cárneo bovino reestruturado, que tanto o óleo, como a farinha ou semente de linhaça dourada tornam-se potenciais ingredientes funcionais para a adição em produtos cárneos, principalmente os hambúrgueres, podendo ser oferecidos aos consumidores com altas expectativas de aceitação de mercado.

2.6. Hambúrguer

Os produtos cárneos representam uma fatia relevante do mercado de alimentos proteicos, exibindo vasto portifólio de produtos, no qual o hambúrguer apresenta característica de praticidade e rapidez em seu preparo, tendo uma expressiva presença nas refeições e lanche de muitas pessoas, independente da classe socioeconômica (OLIVEIRA et al., 2013; SEGANFREDO et al., 2016).

Conforme a Instrução Normativa nº 20 (IN 20), que regulamenta a identidade e qualidade de produtos cárneos tipo hambúrguer, hambúrguer é o produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado, podendo ser um produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado, sendo

permitida a adição de no máximo 4,0% de proteína não cárnea na forma agregada (BRASIL, 2000).

Ainda de acordo com a IN 20, os requisitos das características sensoriais do hambúrguer envolvem textura, cor, sabor e odor próprios. Também, devem atender às seguintes características físico-químicas: máximo de 23% de gordura; mínimo de 15% de proteína; 3% de carboidratos totais; teor de cálcio (máximo base seca) 0,1% em hambúrguer cru e 0,45% em hambúrguer cozido. O acondicionamento prevê embalagem com materiais adequados às condições de armazenamento e que confiram proteção apropriada ao hambúrguer, bem como na exposição à venda, devem ser mantidos sob congelamento.

Por ser um alimento bastante apreciado e consumido por indivíduos de diversas idades em virtude de suas características sensoriais (NILSON; SPANIOL; GONÇALVES, 2016), o consumo de hambúrguer elevou devido à alteração no estilo de vida dos indivíduos com crescente processo de urbanização, industrialização e diminuição do tempo disponível para o preparo de alimentos (OLIVEIRA et al., 2013; NILSON; SPANIOL; GONÇALVES, 2016). Por outro lado, sua ingestão exagerada pode elevar o peso corporal e aumentar os riscos de saúde, pois pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão, obesidade, diabetes *mellitus* e dislipidemia, em razão de um hambúrguer possuir um teor de sódio de até 34% do valor recomendado pela OMS (OLIVEIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2015; LILIC et al., 2015).

Para o desenvolvimento de novos produtos, é fundamental analisar a redução dos teores de sódio em hambúrguer para alcançar um produto que atenda as metas do governo na redução de sódio, como ainda permanecer com as características tecnológicas e sensoriais similares ao produto original. Oliveira et al. (2014) constataram que o hambúrguer adicionado de farinha de linhaça e com teor reduzido de sódio, apresentou características nutricionais e sensoriais satisfatórias, podendo ser considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de um hambúrguer com melhor qualidade nutricional.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na busca por uma melhor qualidade de vida, consumidores procuram alimentos mais saudáveis que possam agregar valor nutricional em suas dietas. A ingestão

excessiva de sal tem mostrado elevar os riscos de uma série de patologias, assim, instituições governamentais propuseram uma meta de redução de sal em alimentos industrializados. Produtos cárneos são os principais alimentos a serem modificados, principalmente os hambúrgueres que são consumidos em larga escala pela maioria da população.

Novos ingredientes têm sido adicionados aos produtos cárneos para minimizar a percepção sensorial da redução do sal. Entre eles pode-se sinalizar que a linhaça, por ser rica em lipídeos poli-insaturados, apresente ótimas perspectivas de resultados positivos. Por outro lado, a adição de aromatizantes que estimulam a percepção do sabor, poderiam elevar a percepção salina nestes produtos com menor teor de sal.

Neste contexto, o grande desafio da indústria alimentícia é desenvolver produtos que agradem os consumidores sensorialmente, apresentando um valor nutricional satisfatório e que sejam seguros à população.

4. REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. C.; BEZERRA, I. N.; Dos SANTOS BARBOSA, F.; JUNGER, W. L.; YOKOO, E. M.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 1, p. 177-189, 2013.

AYERZA, R.; COATES, W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. **Nutrition Research**, v. 25, n. 11, p. 995-1003, 2005.

BARROSO, A. K. M., TORRES, A. G., BRANCO, V. N. C., FERREIRA, A., FINOTELLI, P. V., FREITAS, S. P.; LEÃO, M. H. M. E. D. R. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 181-187, 2014.

BOLGER, Z. B., N. P.; LYNG, J. G.; MONAHAN, F. J. Comminuted meat products - consumption, composition, and approaches to healthier formulations. **Food Reviews International**, v. 33, n. 2, p. 143-166, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Instrução normativa nº 20 de 31 de julho de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de almôndega, de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Regulamento técnico de identidade e qualidade de paleta

cozida, de produtos cárneos salgados, de empanados, de presunto tipo serrano e de prato elaborado pronto ou semipronto contendo produtos de origem animal de 15 de fevereiro de 2001 . **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Alimentação e Nutrição: micronutrientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2012a.

BRASIL. VIGITEL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGLÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS E PROMOÇÃO DE SAÚDE. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2012b.

BRASIL. Termo de Compromisso entre o Ministério da Saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as Associações Brasileiras das Indústrias de Alimentação, das Indústrias de Massas Alimentícias, da Indústria de Trigo e da Indústria de Panificação e Confeitaria. Brasília, 2013. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/termo_nov_2013.pdf . Acesso em: 12 out. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. 156p.

BREWER, M. S. Reducing the fat content in ground beef without sacrificing quality: a review. **Meat Science**, v. 91, n. 4, p. 385-395, 2012.

BRITTON, K. A., MASSARO, J. M., MURABITO, J. M., KREGER, B. E., HOFFMANN, U.; FOX, C. S. Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and all-cause mortality. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 10, p. 921-925, 2013.

CAMPOS, F. B.; FONTES, E. A. F.; CAETANO, S. T. Processo de redução de sódio em hambúrguer de frango. **Revista Científica Univiçosa**, v. 7, n. 1, p. 342-348, 2015.

CARVALHO, C. B., MADRONA, G. S., CESTARI, L. A., GUERRERO, A., SOUZA, N. E.; PRADO, I. N. Sensory profile of beef burger with reduced sodium content. **Acta Scientiarum Technology**, v. 37, n. 2, p. 301-305, 2015.

CASTRO, F. A. F.; LELIS, J. F. **Como utilizar a linhaça.** Viçosa: UFV, 2011.

CHAVES, M. A., DA SILVA, J. M. A., GENIAKE, A. C. V., DOURADO, E. C., DE OLIVEIRA SANTOS, M. P.; BALDISSERA, M. E. Bovine meat hamburger with chia mixed flour, oats and linseed. **Revista Produção e Desenvolvimento**, v. 4, n. 2, p. 21-30, 2018.

CORRÊA, L. P. P.; DE ALMEIDA, P. D. A. Indicadores antropométricos e riscos à saúde da pessoa com deficiência em uma cidade do sul de Minas. **Journal of Management & Primary Health Care**, v. 7, n. 1, p. 54-54, 2017.

COXSON, P. G., COOK, N. R., JOFFRES, M., HONG, Y., ORENSTEIN, D., SCHMIDT, S. M.; BIBBINS-DOMINGO, K. Mortality benefits from US population-wide reduction in sodium consumption: projections from 3 modeling approaches. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 564-70, 2013.

CRUZ, A.G.; FARIA, J. A. F.; POLLONIO, M. A. R.; BOLINI, H. M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; GRANATO, D.; SHAH, N. P. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 276-291, 2011.

DELGADO-PANDO, G., COFRADES, S., RUIZ-CAPILLAS, C., TRIKI, M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chill storage. **Meat Science**, v. 92, n. 1, p. 44-52, 2012.

DESMOND, E. Reducing salt: A challenge for the meat industry. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 188-96, 2006.

FELLENDORF, S.; O'SULLIVAN, M. G.; KERRY, J. P. Impact of ingredient replacers on the physicochemical properties and sensory quality of reduced salt and fat black puddings. **Meat Science**, v. 113, p. 17-25, Mar 2016. ISSN 1873-4138.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO. UNA-SUS/UFMA**. Alimentação, nutrição e a Saúde da Família: alimentação e nutrição no Brasil e as ações governamentais**. São Luís, 2014. 34p.

GARMUS, T. T., BEZERRA, J. R. M. V., RIGO, M.; CÓRDOVA, K. R. V. Avaliação sensorial e físico-química de iogurte enriquecido com farinha de linhaça Sensory evaluation and physical chemistry of yogurt enriched with flaxseed flour. **Ambiência**, v. 12, n. 1, p. 251-258, 2016.

IGNÁCIO, A. K. F.; RODRIGUES, J. T. D.; NIZU, P. Y.; CHANG, Y. K. Effect of the substitution of sodium chloride by potassium chloride in French rolls. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2013.

INGUGLIA, E. S., ZHANG, Z., TIWARI, B. K., KERRY, J. P.; BURGESS, C. M. Salt reduction strategies in processed meat products - A review. **Trends in Food Science & Technology,** v. 59, p. 70-78, 2017.

JUÁREZ, M., DUGAN, M. E. R., ALDAI, N., BASARAB, J. A., BARON, V. S., MCALLISTER, T. A.; AALHUS, J. L. Beef quality attributes as affected by increasing the intramuscular levels of vitamin E and omega-3 fatty acids. **Meat Science**, v. 90, n. 3, p. 764-769, 2012.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1058-1066, 2012.

LILIC, S., BRANKOVICA, I., KORICANACA, V., VRANICA, D., SPALEVICB, L., PAVLOVICC, M.; LAKICEVICA, B. Reducing sodium chloride content in meat burgers by adding potassium chloride and onion. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 164-167, 2015.

LIMA, F. E. T., ARAÚJO, T. L., MOREIRA, T. M. M., LOPES, M. V. O.; MEDEIROS, A. M. Características sociodemográficas de pacientes submetidos à revascularização miocárdica em um hospital de Fortaleza-CE. **Northeast Network Nursing Journal**, v. 10, n. 3, 2016.

MALTA, D. C.; NETO, O. L. M. D.; JUNIOR, J. B. D. S. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 120, n. 4, p. 425-438, 2011.

MARQUES, A. C. **Propriedades Funcionais da linhaça (*Linumusitatissinum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em Alimentos**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado emCiência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

MEDEIROS, M.; GALENO, A. Looking at contemporary food: gastro-anomy and Botero's bodies. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 4, p. 465-472, 2013.

MOODIE, R.; STUCKLER, D.; MONTEIRO, C.; SHERON, N.; NEAL, B.; THAMARANGSI, T.; LINCOLN, P.; CASSWELL, S. Action Group. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. **The Lancet**, v. 381, n. 9867, p. 670-679, 2013.

MOUBARAC, J. C., PARRA, D. C., CANNON, G.; MONTEIRO, C. A. Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. **Curr Obes Rep**, v. 3, n. 2, p. 256-72, 2014.

MOURA, A. D. A.; NOGUEIRA, M. S. Enfermagem e educação em saúde de hipertensos: revisão da literatura. **Journal of Management & Primary Health Care**, v. 4, n. 1, p. 36-41, 2013.

NAVAS-CARRETERO, S., SAN-CRISTOBAL, R., AVELLANEDA, A., PLANES, J., ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Benefits on body fat composition of isocalorically controlled diets including functionally optimized meat products: Role of alpha-linolenic acid. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 319-331, 2015.

NILSON, E. A. F.; SPANIOL, A. M.; GONÇALVES, V. S. S. Reducing sodium intake in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 32, n. 11, 2016.

NOVELLO, D. **Utilização de linhaça dourada (*Linum Usitatissimun* L.) em produto cárneo bovino reestruturado: efeito sobre a composição de ácidos graxos e aceitação sensorial**. 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Golden flaxseed and its byproducts in beef patties: physico-chemical evaluation and fatty acid profile. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1707-1714, 2013.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Avaliação sensorial e da cor objetiva de hambúrgueres congelados formulados com linhaça dourada e derivados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, p. 331-7, 2014.

OLIVEIRA, D. F., COELHO, A. R., BURGARDT, V. C. F., HASHIMOTO, E. H., LUNKES, A. M., MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão**. Brazillian Journal Food Technology,** v. 16, n. 3, p. 163-174, 2013.

OLIVEIRA, D. F., MILESKI, J. P. F., CARLI, C. G., MARCHI, J. F., SILVA, D. C., COELHO, A. R.; TONIAL, I. B. Farinha de linhaça dourada como substituto de gordura animal em hambúrguer de carne bovina com redução de sódio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 273-282, 2014.

PAULSEN, M. T., NYS, A., KVARBERG, R.; HERSLETH, M. Effects of NaCl substitution on the sensory properties of sausages: Temporal aspects. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 164-170, 2014.

PETRACCI, M., BIANCHI, M., MUDALAL, S.; CAVANI, C. Functional ingredients for poultry meat products. **Trends in Food Science & Technology,** v. 33, n. 1, p. 27-39, 2013.

PIRES, A. P. D. S. **Elaboração de hambúrguer bovino com teor reduzido de sódio e adição de potencializadores de sabor**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2016.

PROSPECTOR®. PuraQ®AromeNA4., outubro de 2019. Disponível em: https://www.ulprospector.com/pt/eu/Food/Detail/882/302744/PuraQ-Arome-NA4 . Acesso em: 05 mar.de 2020.

RIBEIRO, V. F.; RIBEIRO, M. D. A.; VASCONCELOS, M. A. D. S.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Processed foods aimed at children and adolescents: sodium content, adequacy according to the dietary reference intakes and label compliance. **Revista de Nutrição,** v. 26, n. 4, p. 397-406, 2013.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science,** v. 70, n. 3, p. 531-41, Jul 2005. ISSN 0309-1740.

SANTOS, B. A. D.; CAMPAGNOL, P. C. B.; MORGANO, M. A.; POLLONIO, M. A. R. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 509-513, 2014.

SARNO, F.; CLARO, R. M.; LEVY, R. B.; BANDONI, D. H.; FERREIRA, S. R. G.; MONTEIRO, C. A. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 219-225, 2009.

SAVAGE, J.; FISHER, J. Parental influence on eating behavior: conception to adolescence. **Journal Law Medical Ethics**, v. 35, n. 1, p. 22-34, 2007.

SCHMIELE, M.; MASCARENHAS, M. C. C. N.; BARRETO, A. C. S.; POLLONIO, M. A. R. Dietary fiber as fat substitute in emulsified and cooked meat model system. **Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 105-111, 2015.

SEGANFREDO, D.; RODRIGUES, S.; KALSCHINE, D. L.; SARMENTO, C. M. P.; CANAN, C. Partial substitution of sodium chloride in Toscana sausages and the effect on product characteristics. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 37, n. 3, p. 1285-1294, maio/jun 2016.

SILVA, J. R. G.; PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, D. C.; SILVA, V. R. O.; BENEVENUTO JUNIOR, A. A.; FRANCO, F. S. C. Technological and sensory analysis of beef burger replacing NaCl with KCl and flavor enhancer. **Acta Scientiarum Technology**, v. 42, p. e45632, 2020.

TALUKDER, S. Effect of dietary fiber on properties and acceptance of meat products: a review**. Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 7, p. 1005-1011, 2015.

TOBIN, B. D.; O'SULLIVAN, M. G.; HAMILL, R. M.; KERRY, J. P. The impact of salt and fat level variation on the physiochemical properties and sensory quality of pork breakfast sausages. **Meat Science**, v. 93, n. 2, p. 145-152, 2013.

TRIKI, M.; HERRERO, A. M.; RODRÍGUEZ-SALAS, L.; JIMENEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA-enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 158-165, 2013.

WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 196-213, 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease**. Geneva: World Health Organization. Technical Report Series, 916. Genebra: World Health Organization, 2003.

CAPÍTULO 6 - REDUÇÃO DE SAL EM PRODUTOS ELABORADOS COM CARNE PSE: MAIS UM DESAFIO PARA A INDÚSTRIA BRASILEIRA

Mariana Pacheco Neves
Marielle Maria de Oliveira Paula
Eduardo Mendes Ramos

1. INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de sódio (Na) nos alimentos tem sido considerado um grande problema de saúde pública, devido à sua associação com quadros de hipertensão e doenças cardiovasculares. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) e a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) firmou acordos para a redução do consumo desse mineral pela população. A expectativa é que até o ano de 2020 as indústrias do setor promovam a retirada voluntária de 28,5 toneladas de sódio dos produtos comercializados no mercado brasileiro

A maior quantidade do sódio ingerido na alimentação humana vem dos alimentos processados, especialmente do sal (cloreto de sódio; NaCl) adicionado na formulação desses produtos. Assim, a redução de sódio em alimentos é obtida a partir da redução e/ou substituição do sal. Entretanto, nos produtos cárneos, além de contribuir com a conservação e conferir o gosto salgado, o sal desempenha um importante papel tecnológico ao solubilizar as proteínas da carne, contribuindo com a sua capacidade de retenção de água e emulsificação das gorduras. Dessa forma, tendo em vista que induz perdas no processo e afetar diretamente o rendimento e a qualidade do produto, são necessárias pesquisas para avaliar os melhores substitutos do sal na formulação de produtos cárneos. A substituição do NaCl por outros sais tem sido sugerida para garantir a força iônica necessária para solubilizar as proteínas cárneas, sendo o cloreto de potássio (KCl) o substituto mais estudado e com bons resultados tecnológicos e sensoriais.

Outro fator relevante no processamento de produtos cárneos com baixo teor de sal está relacionado à qualidade da matéria-prima, principalmente aquela associada à anomalia PSE (do inglês *pale*, *soft and exudative*): carnes pálidas, de textura flácida e bastante exsudativa. Devido à suas características, a utilização da carne PSE no processamento acarreta perdas associadas ao rendimento, coloração e textura do produto. A incidência desta anomalia é alta na obtenção de carne suína, especialmente no Brasil, de forma que as carnes PSE são comumente utilizadas pela indústria no

processamento de produtos cárneos. Neste cenário, a redução de sódio em produtos cárneos é ainda mais desafiadora para indústria brasileira, uma vez que a presença da carne PSE na formulação contribui com os mesmos problemas da redução de sal.

2. SAL EM PRODUTOS CÁRNEOS

Sal é um nome genérico para uma família de substâncias com características químicas comuns, sendo que a mais importante para o ser humano é o cloreto de sódio (NaCl) ou "sal de cozinha". Esse, do ponto de vista nutricional, é fundamental para a saúde humana não apenas por ser utilizado de maneira universal no preparo e no processo de industrialização dos alimentos, mas também por ser consumido regularmente nas principais refeições do brasileiro (FORTES et al., 2012).

O principal uso do sal está direcionado à função de salgar e realçar o sabor ou, ainda, de conservar os alimentos, além de desempenhar várias funções envolvidas nos processamentos alimentícios (PANOUILLÉ et al., 2011). No entanto, o sal contribui com significativa parcela do sódio presente em alimentos industrializados. A ingestão excessiva de sódio tem sido associada com a hipertensão que pode levar a um aumento do risco de acidentes vasculares cerebrais e doenças vasculares fatais (HE; MACGREGOR, 2010). Além disso, tem sido associada com outros problemas de saúde, como câncer de estômago e doenças renais (SLOAN, 2010).

O teor de sódio em produtos cárneos pode superar facilmente concentrações de 1% e 2% (DESMOND, 2006). No Brasil, o consumo médio de sódio excede em mais de duas vezes a ingestão máxima (dois gramas por dia) recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SARNO et al., 2013) e, por este motivo, os órgãos de saúde e indústria têm buscado sua redução nos alimentos industrializados, cuja participação na alimentação da população brasileira tem aumentado. Algumas ações para a redução do consumo de sódio estão incluídas no Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis, incluindo a redução voluntária de sódio em alimentos processados, o aumento da oferta de alimentos saudáveis, a rotulagem e informação ao consumidor e a educação e sensibilização para consumidores, indústria e profissionais de saúde (IDEC, 2014).

Acordos voluntários vêm sendo firmados entre a indústria de alimentos e o governo federal brasileiro, desde 2011, a fim de reduzir o teor de sódio nos alimentos

processados. Em abril de 2011, o primeiro termo de compromisso, nome oficial dos acordos voluntários, foi assinado entre o Ministério da Saúde (MS) e a indústria. No total, cinco termos de compromisso relativos à redução dos teores de sódio foram assinados entre abril de 2011 e novembro de 2013; dos cinco acordos realizados, quatro referem-se a metas de redução de teor de sódio por categorias de alimento, e apenas um acordo diz respeito à pactuação para o monitoramento dessas metas. O acordo para redução de sódio em produtos cárneos encontra-se no quinto termo e foram firmados (pelo lado do setor privado) como a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) e outras associações diretamente ligadas às categorias de alimentos, como a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suíça (ABIPECS), o Sindicato da Indústria de Carnes e Derivados no Estado de São Paulo (SINDICARNES) e a União Brasileira de Avicultura (UBABEF). Em junho de 2017, um novo acordo foi firmado, válido para os quatro anos seguintes, o qual a meta é a retirada de 28,5 toneladas de sódio da alimentação dos brasileiros (PAULA, 2018).

2.1. Influência do sal nas propriedades sensoriais

A capacidade de propiciar gosto salgado aos alimentos tornou-se a aplicação tecnológica mais conhecida do NaCl. A percepção do salgado é possível devido à presença de canais iônicos específicos para os íons sódio (Na^+) presentes na membrana apical de células receptoras situadas na língua. Quando permeados por esses cátions, tais receptores transmitem sinais para o cérebro promovendo a percepção do salgado. Outros íons, como o potássio (K^+), por não se adequarem a esses canais não propiciam pelo mesmo mecanismo a percepção do gosto salgado pelos indivíduos (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

A identificação do gosto salgado também sofre influência da rotina dos níveis de NaCl comumente presentes na dieta dependendo da frequência e quantidade de consumo. A redução de sua concentração durante algum tempo é acompanhada de novo patamar de percepção pelos consumidores sem que ocorram prejuízos significativos à aceitação do produto (VANDENDRIESSCHE, 2008). No entanto, a redução do sal na dieta deve ser gradativa (ao longo de meses) para que a aceitabilidade dos alimentos não seja comprometida (DESMOND, 2006).

2.2. Influência do sal nas propriedades tecnológicas

Uma das principais funções do NaCl em produtos cárneos processados é a solubilização das proteínas miofibrilares actina e miosina. Estas proteínas são dependentes da força iônica (concentração total de eletrólitos em solução) do meio, sendo insolúveis em baixas concentrações de sal, entretanto tornam-se totalmente solúveis em altas concentrações de sal (MATTEWS; STRONG, 2005).

O efeito do sal sobre as proteínas da carne é causado, provavelmente, pelo fato de o íon cloro (Cl-) ser mais fortemente ligado às proteínas que o íon sódio (Na+), o que provoca um aumento nas cargas negativas das mesmas (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). A solubilidade em água depende da distribuição de grupos polares e não polares na lateral da cadeia do aminoácido e das espécies iónicas presentes em soluções (CURTIS; LUE, 2006). O aumento da força iônica com a adição de sal aumenta a solubilidade das proteínas miofibrilares, pois os íons salinos tendem a se associar às proteínas, contribuindo para sua maior hidratação e repulsão (entre as proteínas miofibrilares). Em baixas concentrações de sal (abaixo de 4%), há uma redução das interações eletrostáticas entre os domínios hidrofílicos da proteína, o que permite nova solubilização pelo aumento da carga de proteína e maior repulsão eletrostática entre proteína-proteína. Este fenômeno é denominado salting in e gera um efeito combinado que aprisiona camadas de moléculas de água entre os miofilamentos dentro do sarcômero. Entretanto em elevada concentração de sal (acima de 4%) ocorre o fenômeno de salting out, em que a solubilidade da proteína é reduzida com o aumento da força iônica. Neste caso, os íons salinos formam sua própria capa de hidratação, competindo com a proteína pela água e ocasionando perda de água de hidratação pelas moléculas proteicas. Isto também resulta no aumento da interação proteína-proteína, o que contribui para a redução do espaço intramiofibrilar e, consequentemente, maiores perda de água e das propriedades funcionais das proteínas (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

A maioria dos produtos cárneos depende da solubilização das proteínas miofibrilares e sua extração, seja para aumentar o rendimento pela retenção de água, emulsificar gordura ou para melhorar a liga entre peças cárneas, gerando características de textura (MATTEWS; STRONG, 2005). Com a solubilização e extração das proteínas miofibrilares pelo sal, ocorre um aumento na capacidade de retenção de água (CRA), e

esse fenômeno influencia as características de liga e textura do produto. O NaCl também melhora as propriedades de ligação de gordura (capacidade emulsionante; CE) nos produtos cárneos resultando na formação de uma textura de gel desejável no cozimento. Aumentando a CRA e CE, as perdas durante o cozimento são diminuídas conferindo suculência e maciez ao produto (DESMOND, 2006).

O sal também tem ação inibidora contra muitos microrganismos deterioradores e patogênicos em carne, devido à sua capacidade de reduzir a atividade de água do alimento e, consequentemente, alterar a sua pressão osmótica, o que é uma condição adversa para a maioria das bactérias contaminantes. Ao se basear na proteção do alimento atrás do conceito de "tecnologia de barreiras" em que cada ator conservante exerce um papel importante na vida útil final do produto, pode-se inferir que uma redução dos níveis de NaCl sem outras medidas conservantes adicionais resulte na redução da vida útil e da segurança do produto (SOFOS, 1986).

2.3. Redução do sódio em produtos cárneos

Assim como para maioria dos produtos alimentícios industrializados, a redução de sódio em produtos cárneos implica na redução da quantidade do sal NaCl na formulação. Isto é um grande problema, pois, conforme descrito anteriormente, diminuir o teor de sal em produtos cárneos tem muitas implicações tecnológicas negativas, incluindo mudanças de textura, diferenças de sabor e da aparência, redução da segurança microbiológica e diminuição do rendimento no processamento.

Diversas pesquisas têm sido conduzidas para contornar os problemas tecnológicos associados à redução de sal em produtos cárneos. As tendências atuais do uso de NaCl em indústrias de alimentos indicam uma substituição, ou uma redução do sal com base na avaliação sensorial, fazendo uso de realçadores de sabor e ingredientes como ervas e especiarias, bem como a otimização da forma física do sal e aplicação de novas técnicas de processamento ou modificações do processo, como ultrassom e alta pressão hidrostática (ALBARRACÍN et al., 2011; KANG et al., 2014; CHOI et al., 2014; PAULA, 2018). Em hambúrgueres desenvolvidos no IF Sudeste MG, Pires (2016) concluiu que é possível a redução do teor de sal com a adição de realçadores de sabor comerciais, obtendo-se produtos com características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais semelhantes ao produto sem nenhuma redução.

Entretanto, em produtos com características tecnológicas mais específicas, como em curados e emulsionados, a forma mais simples de redução do sal seria por meio da sua substituição parcial por outro sal de cloreto, como o de potássio (KCl), de cálcio ($CaCl_2$) e de magnésio ($MgCl_2$), ou mesmo por sais de fosfatos (MARCHETTI et al., 2015). Não está referenciado). Do ponto de vista tecnológico, esses sais têm sido utilizados para garantir a força iônica necessária para aprimorar a extração e a solubilidade das proteínas. O KCl fornece uma das substituições mais diretas devido à sua similaridade na composição molecular com NaCl, mantendo a extração das proteínas miofibrilares (NEVES et al., 2020).

Apesar de amplamente estudado como substituto do NaCl, a adição de KCl em concentrações superiores a 30-40% tem resultado em um sabor metálico, afetando as propriedades sensoriais do produto (GELEIJNSE; KOK; GROBBEE, 2003).

Em trabalho desenvolvido no IF Sudeste MG, NEVES et al. (2017) observaram que a percepção de gosto salgado em apresuntados reduziu com a redução de NaCl. Entretanto, as amostras com reduções de 50 e 60% de sal (que corresponde a 27 e 33% na redução de sódio, respectivamente) e com substituição de 40% do NaCl por KCl (redução de 33% de sódio) tiveram níveis de percepção de gosto salgado similares. Porém, proporções maiores que 40% de substituição por KCl implicaram em amostras com menor percepção de salgado e ligeiro aumento da percepção de gosto amargo.

Greiff et al. (2015), ao avaliarem a redução gradual do sódio em presuntos cozidos, não obtiveram diferença significativa para as propriedades de CRA, pH, umidade e atributos sensoriais ao substituir 25% de NaCl por KCl. Porém, uma substituição na base molar do sal em 60% e 80% resultou em perda da CRA. Em relação aos atributos sensoriais, a redução de até 40% (que corresponde a 2,04% de sal) não influenciou significativamente o sabor salgado.

Yotsuyanagi et al. (2016), ao avaliarem as propriedades tecnológicas, sensoriais, microbiológicas e seus impactos na redução de sal em salsichas Frankfurt, concluíram que a redução de 25% de NaCl, com a redução de 18% de sódio, e adição de 0,25% de fosfato e 0,85% de KCl não afetou os atributos sensoriais nem o rendimento, a perda de água e a qualidade microbiológica durante o armazenamento.

Em um trabalho realizado por Horita et al. (2014) que visou avaliar a redução de sódio de salsichas Frankfurts utilizando misturas de substitutos de sal contendo KCl,

$CaCl_2$ e NaCl, foi observado que a presença de $CaCl_2$ como substituto parcial dos sais na mistura contribuiu negativamente para as propriedades funcionais dos produtos, proporcionando menor estabilidade de emulsão, enquanto o KCl apresentou melhor comportamento nessas propriedades, sendo o mais indicado para a substituição em salsichas, apresentando ainda melhor desempenho sensorial, quando comparado à amostra controle.

O uso de ingredientes de substituição e seu impacto no gosto do produto, depende, não apenas do tipo de substituição utilizado, mas também do tipo do produto, da carne e da sua formulação (FELLENDORF et al., 2016). Paulsen et al. (2014), ao avaliarem diferentes substitutos (KCl, Na-lactato, K-lactato, Na-diacetato e minerais do leite) para o NaCl em embutidos cárneos, observaram diferenças na percepção do gosto salgado no embutido, com reduzido teor de sódio em comparação com a amostra controle.

Dos Santos et al. (2014), produziram salames substituindo 50% e 75% de NaCl por KCl. A substituição de 50% e 75% de NaCl por KCl depreciou a qualidade sensorial dos produtos, já que os salames reformulados contendo glutamato monossódico, combinados com lisina, taurina, inosinato dissódico e guanilato dissódico, mascararam os atributos sensoriais indesejáveis associados à reposição de 50% e 75% de NaCl com KCl, sendo suficiente para remover os defeitos causados por 75% de substituição de NaCl com KCl.

3. QUALIDADE DA CARNE SUÍNA

Diferentes enfoques por parte das indústrias e dos consumidores são utilizados para determinar a qualidade da carne suína (DALLA COSTA et al., 2010). As indústrias utilizam como parâmetros de qualidade: o percentual de carne magra, rendimento de cortes, necessidade mínima de acabamento, aparência atrativa e alta estabilidade durante a estocagem a frio; e os consumidores, além do aspecto nutricional, percebem como relevantes os aspectos sensoriais, que são responsáveis pela continuidade da aquisição do produto.

O pH é um dos melhores preditores das qualidades tecnológicas e sensoriais da carne, sendo por isso um dos mais utilizados. O controle de pH é importante, pois está relacionado à cor, à maciez, à textura e CRA da carne (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013).

A qualidade da carne suína está principalmente associada ao manejo, pré-abate dos animais e ao fator genético (WARNER; KAUFFMANM; GREASER, 1997; MOURA et al., 2015). Após o abate, o músculo sofre uma série de alterações bioquímicas e físicas, em um processo no qual este é transformado em carne. Neste processo, o glicogênio presente nas fibras musculares é metabolizado a lactato, por meio da glicólise anaeróbica, reduzindo gradativamente o pH muscular. Entretanto, em situações específicas, o pH pode diminuir a uma taxa muito alta, influenciando as características tecnológicas finais, como maciez, cor e CRA, gerando carnes anômalas. O tempo necessário para a carne atingir o pH final varia de acordo com a espécie animal, a temperatura e velocidade de resfriamento e as condições pré-abate, mas, em condições normais, a acidose muscular cessa em um período de 24 h (DALLA COSTA et al., 2010; GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013; MOURA et al., 2015).

Várias curvas de queda de pH foram propostas para explicar as anomalias durante as transformações musculares *post mortem*, mas a qualidade da carne pode ser avaliada em função de três condições comumente conhecidas: carne normal (RFN); carne DFD; e carne PSE. A carne normal, representada pela sigla RFN (do inglês *red, firm and normal*), é aquela considerada adequada, apresentando uma cor rosa avermelhada, textura firme e pouco exsudativa (exsudação normal). A carne de corte escuro, representada pela sigla DFD (do inglês *dark, firm and dry*), apresenta características anormais devido a seu aspecto escuro, textura firme e aparência seca (não-exsudativa), e a carne PSE (do inglês *palide, soft and exsudative*) que possui uma cor pálida, textura flácida e elevado grau de exsudação. Outras condições anômalas, que possuem características intermediárias entre os extremos DFD e PSE, são descritas na literatura, como a carne rosa-avermelhada, de textura flácida e exsudativa (RSE) e a carne pálida, de textura firme e pouco exsudativa (PFN) (WARNER; KAUFFMANM; GREASER, 1997; RAMOS; GOMIDE, 2007).

3.1. Critérios de classificação da qualidade da carne

A previsão da qualidade da carne suína é decisiva para o sucesso da indústria, pois a detecção eficaz de carnes de baixa qualidade é importante para a sua destinação. Vários critérios são propostos para classificar a carne suína quanto à qualidade, mas não há um

consenso internacional sobre o melhor critério a ser usado (CAZEDEY et al., 2016). A capacidade de classificação destes métodos depende dos atributos de qualidade e seus valores de parâmetros utilizados na caracterização da carne suína, o que pode explicar grande variação na incidência de PSE relatada na literatura (JOO et al., 2000).

A maioria dos critérios propostos na literatura para classificar a carne suína é por meio das análises de pH final (24 h *post mortem*), luminosidade (*L**) e perda por gotejamento (WARNER; KAUFFMANM; GREASER, 1997). Estes importantes atributos de qualidade estão correlacionados com a apreciação sensorial da carne suína por consumidores (HUFF-LONERGAN et al., 2002; VAN OECKEL; WARNANTS; BOUCQUÉ, 2003). Torres Filho et al. (2018) avaliaram a capacidade de classificação de qualidade da carne suína por análise hierárquica de grupos em relação aos critérios de referência propostos na literatura, propuseram valores de parâmetros que podem ser usados para distinguir entre as cinco categorias, baseadas apenas em valor de luminosidade (*L**) e perda por gotejamento (PPG), ficando da seguinte forma:

PSE: $L^* > 52$ e PPG > 6%;
RSE: L^* entre 44 e 52 e PPG > 6%;
PFN: $L^* > 52$ e PPG entre 2 e 6%;
RFN: L^* entre 44 e 52 e PPG entre 2 e 6%; e
DFD: $L^* < 44$ e PPG < 2%.

3.2. Carne PSE

A carne PSE tem sido uma preocupação contínua para a indústria da carne suína, devido à sua qualidade tecnológica inferior e sua menor aceitação pelo consumidor, gerando grandes perdas econômicas na indústria frigorífica e de produtos cárneos (O'NEILL et al., 2003) A principal causa do desenvolvimento desta anomalia está associada a uma decomposição acelerada do glicogênio muscular após o abate, induzindo baixos valores de pH (< 5,8) na primeira hora *post mortem* enquanto a temperatura do músculo ainda está próxima do estado fisiológico (>38°C). Isto acarreta um processo de desnaturação proteica, comprometendo as propriedades funcionais e tecnológicas da carne (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013).

Em consequência da desnaturação ocorrida, as proteínas perdem sua funcionalidade, afetando a capacidade de retenção de água, de ligação e de emulsificação das carnes. A extensão dos filamentos de miosina é reduzida em cerca de 8-10% durante o processo de desnaturação, o que diminui a capacidade da carne em reter a água presente nos tecidos, o que explica algumas características tecnológicas como aspecto "molhado", perda de peso por gotejamento e um baixo rendimento. Ocorre também, a alteração da estrutura tridimensional, o que leva a uma menor firmeza da estrutura global, afetando a textura. A coloração pálida destas carnes é explicada pelo baixo volume miofibrilar do tecido muscular, o que lhes confere uma grande capacidade de dispersão de luz. A mioglobina não consegue absorver a luz, que acaba por não penetrar na carne e se dispersa pela sua superfície (RAMOS; GOMIDE, 2017).

Vilaça (2016) observou uma incidência de carne PSE de 26,6% no do Setor de Indústria e Beneficiamento de Carnes do IF Sudeste MG, Campus Barbacena. No entanto, apesar de pesquisas brasileiras relatarem uma incidência entre 10 e 46% nas indústrias de carne suína, Cazedey et al. (2016) observaram que, em virtude dos diferentes critérios utilizados na literatura, a incidência de PSE pode variar de 3 a 68%.

O menor pH encontrado na carne PSE contribui para à sua conservação do ponto de vista microbiológico, mas torna essa carne mais suscetível a oxidação lipídica (O'NEILL et al., 2003). Do ponto de vista sensorial, a carne PSE pode contribuir com um sabor mais acentuado, o que se deve à grande concentração de inosina-5'-monofosfato (IMP) nestas carnes, um realçador de sabor e importante precursor não volátil do aroma de carne (PAULA, 2018).

O fenômeno PSE é prejudicial, especialmente no lombo e pernil suíno, devido ao valor comercial e possibilidade de utilização destes cortes no processamento. A utilização de carnes PSE na fabricação de produtos cárneos não apresenta nenhuma vantagem do ponto de vista tecnológico, pois a falta de proteína funcional provoca baixa capacidade de liga (rachaduras), fatiabilidade e de retenção de água, bem como má formação da cor curada (HADDAD et al., 2018). Existem alguns aditivos utilizados pela indústria alimentícia que permitem corrigir, até certo ponto, as insuficiências e eventuais defeitos da matéria-prima, porém, não existe qualquer substância que permita recuperar a funcionalidade das proteínas da carne após desnaturação (O'NEILL et al., 2003).

Vilaça (2016) ao avaliar apresuntados elaborados com carne PSE observaram que os produtos apresentaram maiores perdas de massa na sinérese, por exsudação e por reaquecimento do que apresuntados elaborados com carne RFN. A cor dos apresuntados não foi afetada pela elaboração com carne PSE, mas menores valores nos parâmetros de textura, dureza e mastigabilidade foram observados.

Motzer et al. (1998) avaliaram o efeito do amido modificado, proteína de soja e carragena para fabricação de presuntos com diferentes teores de carne PSE. Concluíram assim, que a utilização de misturas de carne normal juntamente com PSE (50/50), quando utilizado amido modificado na formulação, rendeu um produto com aparência normal. Os resultados ainda sugeriram a possibilidade de aumentar a funcionalidade de carne PSE, retendo água, especialmente com a utilização de amido modificado.

Schilling et al. (2004) determinaram os efeitos do concentrado de proteína de soja, caseinato de sódio e amido modificado, na CRA e na cor de presuntos elaborados com combinações de carne PSE e normais (RFN). Os autores concluíram que a adição de 2% proteína de soja e 1,5% amido modificado possui potencial para melhorar a CRA e cor cozida em carne PSE, bem como RFN. Além disso, este estudo também demonstrou que presunto com até 25% de carne PSE tem alta qualidade.

Kissel et al. (2009) avaliaram as propriedades funcionais de mortadelas formuladas com carne PSE e concluíram que ingredientes emulsionantes como a proteína de soja, amido de mandioca e tripolifosfato de sódio são capazes de aumentar a capacidade de retenção de água, capacidade de emulsão e ainda melhorar as propriedades texturais de dureza e mastigabilidade no produto.

4. REDUÇÃO DE SAL EM PRODUTOS ELABORADOS COM CARNE PSE

Muito tem se estudado sobre a redução de sódio e sobre o uso de carne PSE em produtos cárneos. Porém, poucos estudos avaliaram ambos os fatores em conjunto. Neste sentido, as principais pesquisas encontradas foram realizadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG).

Haddad et al. (2018) relacionaram a utilização de carne PSE juntamente com a redução de sal na elaboração de lombos tipo canadense. Os produtos foram fabricados

com diferentes teores de carne PSE e sal, mas contendo em sua formulação 0,5% de carragena, 2% de concentrado proteico de soro e 0,5% de maltodextrina. Os autores relataram que a adição de quantidades de sal maiores ou iguais a 1% permitiu a elaboração de produtos semelhantes aos comerciais, mantendo as características dos lombos tipo canadense, e que em uma maior redução de sal, o seu efeito foi maior do que os da adição de carne PSE no produto. Com o auxílio dos extensores utilizados na formulação do produto e a adição mínima de 1% de sal, o uso de carne PSE influenciou apenas a perda de peso por reaquecimento, indicando que, quando o produto não for destinado à elaboração e pratos prontos, o uso de carne PSE não é prejudicial. Porém, produtos sem adição de sal e com 50% de carne PSE, e produtos com 1% de sal e elaborados apenas com carne PSE, foram menos aceitos. Além disso, para a manutenção da qualidade tecnológica do produto, seria necessária uma adição mínima de 1% sal, quando se utiliza carne PSE na formulação.

Paula et al. (2019) avaliaram a qualidade tecnológica e sensorial de apresuntados elaborados com carne PSE e normal (RFN) com diferentes concentrações de sal (0,8%, 1,2%, 1,6%, 2,0% e 2,4%). Estes autores observaram que o sal apresentou um efeito maior nas perdas de peso dos produtos e na sua dureza, enquanto que a carne PSE interferiu em alguns parâmetros de textura como a flexibilidade e tonalidade dos apresuntados. Sensorialmente, os produtos elaborados com carne PSE apresentaram um aumento da percepção do gosto salgado dos apresuntados, quando esta carne foi utilizada, além disso, os provadores preferiram as amostras elaboradas com carne PSE quando utilizadas as menores concentrações de sal. Os autores concluíram que a concentração de sal de 1,2% foi satisfatória para a manutenção das características tecnológicas e sensoriais dos produtos.

Em outro trabalho, Paula et al. (2020) avaliaram os efeitos da utilização de diferentes concentrações de sal (1,2%, 1,6% e 2,0%) e utilização de carne PSE no perfil sensorial de apresuntados, utilizando os testes de aceitação, *check-all-that-apply* (CATA) e de dominância temporal das sensações (TDS). A utilização destas técnicas resultou em informações relevantes sobre o perfil sensorial dos apresuntados, demonstrando que o uso de carne PSE na elaboração de produtos curados cozidos foi capaz de aumentar a percepção sensorial associada ao gosto e sabor característico dominante. Os apresuntados elaborados com PSE e menores concentrações de sal foram os mais

aceitos. Os autores concluíram que a aceitação sensorial não é um empecilho para se alcançar as metas de reduzir o teor de sal em produtos cárneos elaborados com carne PSE.

Recentemente, em estudo realizado no IF Sudeste MG, Neves et al. (2020) avaliaram os efeitos na qualidade tecnológica e sensorial de apresuntados elaborados com diferentes proporções de carne PSE (0, 50 e 100%) e com substituição de 40% do NaCl por KCl. A substituição do NaCl por KCl permitiu uma redução estimada de 24% do teor de NaCL, afetando apenas os atributos de textura e mastigabilidade, sem nenhum efeito detectável nas características sensoriais. O uso de carne PSE reduziu a fatiabilidade do produto, mas aumentou a aceitação de todos os atributos sensoriais analisados, além de permitir maior percepção do sabor salgado. Assim, considerando a necessidade de redução de sódio e o uso de carne de PSE em produtos à base de carne, os autores concluíram que a substituição de 40% NaCl por KCl foi eficaz para manter a qualidade tecnológica e sensorial dos produtos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O consumo excessivo de sódio nos alimentos tem sido considerado um grande problema de saúde pública. Com a atual necessidade de redução de sódio e a grande incidência de carne PSE no Brasil, a indústria brasileira precisa buscar alternativas com o intuito de reduzir o impacto destas novas exigências na qualidade de seus produtos. Pesquisas recentes apontam para o fato de que a percepção sensorial será o menor dos problemas, pois tem sido relatado que a aceitação de produtos cárneos curados de sabor e aroma bem característicos, como apresuntados, é bem adequada quando elaborados com carne PSE e teor reduzido de sal.

No entanto, misturas de carnes normais com carnes PSE, assim como o uso de aditivos e ingredientes com potencial de melhorar a capacidade de liga e de retenção de água, têm sido sugeridas a fim de suprir os possíveis defeitos gerados pelo processamento da carne PSE, auxiliando na manutenção da qualidade do produto A substituição de 40% do sal NaCl por KCl é uma das alternativas viáveis para se alcançar este objetivo.

6. REFERÊNCIAS

ALBARRACÍN, W. *et al*. Salt in food processing; usage and reduction: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1329–1336, 2011.

CAZEDEY, H. P. *et al.* Comparison of different criteria used to categorize technological quality of pork. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2241-2248, 2016.

CHOI, Y. M. *et al*. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. **Meat Science,** v.96, n.1, p. 21–25, 2014.

CURTIS, R. A.; LUE, L. A molecular approach to bioseparations: protein–protein and protein–salt interactions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 3, p. 907–923, 2006.

DALLA COSTA, O. A. *et al*. Efeito das condições pré-abate sobre a qualidade da carne de suínos pesados. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 391-402, 2010.

DESMOND, E. Reducing salt: A challenge for the meat industry. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p.188-196, 2006.

dos SANTOS, B. A. *et al*. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 509-513, 2014.

FELLENDORF, S. *et al*. Impact of ingredient replacers on the physicochemical properties and sensory quality of reduced salt and fat black puddings. **Meat science**, v. 113, p. 17-25, 2016.

FORTES, A. C. B. *et al*. Percepção sensorial e análise química de tempero e sal hipossódico como alternativas para dietas hipossódicas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 164-172, 2012.

GELEIJNSE, J. M.; KOK, F. J.; GROBBEE, D. E. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: A metaregression analysis of randomized trials**. Journal of Human Hypertension**, v. 17, n. 7, p. 471–480, 2003.

GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M.; FONTES, P. R. **Ciência e Qualidade da Carne**: Fundamentos. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 2013. 197p.

GREIFF, K. *et al*. Gradual Reduction in Sodium Content in Cooked Ham, with Corresponding Change in Sensorial Properties Measured by Sensory Evaluation and a Multimodal Machine Vision System. **Plos One**, v. 10, n. 9, 2015.

HADDAD, G. D. B. S. *et al*. The effects of sodium chloride and PSE meat on restructured cured-smoked pork loin quality: A response surface methodology study. **Meat Science**, v. 137, n. 1, p. 191-200, 2018.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 52, n. 5, p. 363-382, 2010.

HORITA, C. N. *et al*. Textural, microstructural and sensory properties of reduced sodium frankfurter sausages containing mechanically deboned poultry meat and blends of chloride salts. **Food Research International**, v. 66, p. 29–35, 2014.

HUFF-LONERGAN, E. *et al*. Correlations among selected pork quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 3, p. 617-627, 2002.

IDEC. INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. **Redução de sódio em alimentos: uma análise dos acordos voluntários no Brasil**. Cadernos Idec – Série Alimentos– v.1, São Paulo: Idec, 2014.

JOO, S. T. *et al*. Objectively predicting ultimate quality of post-rigor pork musculature: I. Initial comparison of techniques. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 1, p. 68-76, 2000.

KANG, Z. *et al*. Effect of beating processing, as a means of reducing salt content in frankfurters: A physico-chemical and Raman spectroscopic study. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 171–177, 2014.

KISSEL, C. *et al*. Functional properties of PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler meat in the production of mortadella. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, n. SPE, p. 213-217, 2009.

MARCHETTI, L. *et al*. Sodium-reduced lean sausages with fish oil optimized by a mixture design approach. **Meat Science**, v. 104, p. 67-77, 2015.

MATTEWS, K.; STRONG, M. Salt – its role in meat products and the industry's action plan to reduce it. **Nutrition Bulletin**, v. 30, n.1, p. 55-61, 2005.

MOTZER, E. A. *et al*. Quality of Restructured Hams Manufactured with PSE Pork as Affected by Water Binders. **Journal of Food Science,** v. 63, n. 6, p. 1007-1011, 1998.

MOURA, J. W. F. *et al*. Fatores influenciadores na qualidade da carne suína. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 17, n. 1, p. 18-29, 2015.

NEVES, M. P. *et al*. Effect of pork quality and salt replacer KCl on technological and sensorial characteristics of restructured cooked hams. **Food Science and Technology International**, 2020. *In* press.

NEVES, M. P. *et al*. Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em produto cárneo curado cozido. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 3793-3797, 2017.

O'NEILL, D. J. *et al*. Effects of PSE on the quality of cooked hams. **Meat Science**, v. 64, n. 2, p. 113-118, 2003.

PANOUILLÉ, M. *et al*. Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 716-723, 2011.

PAULA, M. M. O. *et al*. Effects of PSE meat and salt concentration on the technological and sensory characteristics of restructured cooked hams. **Meat Science**, v. 152, p. 96-103, 2019.

PAULA, M. M. O. *et al*. Temporal dominance of sensations and CATA analysis of restructured cooked hams elaborated with different salt content and pork quality meats. **Food Science and Technology International**, 2020. *In press*.

PAULA, M. M. O. **Qualidade tecnológica e sensorial de apresuntados elaborados com carnes PSE e RFN e diferentes concentrações de sal**. 2018. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

PAULSEN, M. T. *et al*. Effects of NaCl substitution on the sensory properties of sausages: Temporal aspects. **Meat science**, v. 98, n. 2, p. 164-170, 2014.

PIRES, A. P. S. **Elaboração de hambúrguer bovino com teor reduzido de sódio e adição de potencializadores de sabor**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, Rio Pomba, 2016.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes**: Fundamentos e Metodologias. Viçosa: Editora UFV, 2007. 599p.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3 p. 531-541, 2005.

SARNO, F. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 571-578, 2013.

SCHILLING, M. W. *et al*. Utilization of response surface modeling to evaluate the effects of non-meat adjuncts and combinations of PSE and RFN pork on water holding capacity and cooked color in the production of boneless cured pork. **Meat Science**, v. 66, n. 2, p. 371-381, 2004.

SLOAN, A. E. Top 10 functional food trends. **Food Technology**, v. 64, n.4, p. 22, 2010.

SOFOS, J. N. Use of phosphates in low-sodium meat products. **Food technology**, v. 40, n.9, p. 52-67, 1986.

TORRES FILHO, R. A. *et al*. Classification of pork quality by hierarchical cluster analysis. **British Food Journal**, v. 120, n. 7, p. 1446-1456, 2018.

VAN OECKEL, M. J.; WARNANTS, N.; BOUCQUÉ, C. Comparison of different methods for measuring water holding capacity and juiciness of pork versus on-line screening methods. **Meat Science**, v. 51, n. 4, p. 313-320, 1999.

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

VILAÇA, L. C. **Avaliação da incidência de carne PSE em suínos e de seu emprego na elaboração de apresuntados**. 2016. 33f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2016.

WARNER, R.D.; KAUFFMANM, R.G.; GREASER, L. Muscle protein changes *post mortem* in relation to pork quality traits. **Meat Science**, v. 45, n. 3, p. 339-352, 1997.

YOTSUYANAGI, S. E. *et al*. Technological, sensory and microbiological impacts of sodium reduction in frankfurters. **Meat science**, v. 115, p. 50-59, 2016.

CAPÍTULO 7 - COLONIZAÇÃO INTESTINAL E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO KEFIR ADICIONADO DE MEL

Thatiana Lopes de Oliveira
Eliane Maurício Furtado Martins
Maurilio Lopes Martins
Roselir Ribeiro da Silva
Welliton Fagner da Cruz
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

1. INTRODUÇÃO

Quefir ou kefir é um produto originário da Rússia, mais especificamente das montanhas do Cáucaso (SANTOS et al., 2012; LEITE et al., 2013). Caracteriza-se por ser uma bebida fermentada, apresentando diversos efeitos benéficos a saúde (MOREIRA et al., 2008). Seus grãos são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*), leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces cerevisae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp*. thermophilus* (BRASIL, 2007).

A presença de uma microbiota diversificada torna-se a principal característica do kefir. Os lactobacilos, lactococos, bactérias do ácido acético e leveduras presentes nos grãos são mantidos unidos pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras. As leveduras proporcionam características singulares ao produto tanto pelo aroma como pela síntese de vitaminas do complexo B e ainda pela produção de etanol e CO_2, mesmo após refrigeração (COSTA; ROSA, 2016).

Segundo Leite et al. (2013), vários estudos *in vitro* e com animais, associam o consumo de kefir com benefícios à saúde como, melhora da intolerância à lactose, imunomodulação, inibição de microrganismos patogênicos e regulação da microbiota intestinal.

O cultivo do kefir pode ocorrer em diferentes substratos, como leite, suco de frutas ou açúcar mascavo (MOREIRA et al., 2008), além de outros alimentos como por exemplo o mel.

O mel é um oligossacarídeo, que exerce efeito prebiótico, estimulando o crescimento seletivo de bactérias desejáveis no intestino (MACEDO et al., 2008). Os oligossacarídeos, os fruto-oligossacarídeos, a inulina e oligofrutose apresentam grande relevância nutricional e tecnológica, propiciando aumento no teor de fibras dos produtos, e exercendo atividade bifidogênica quando inseridos no alimento (COSTA et al., 2013).

Dentre os benefícios do mel, podem ser citados o efeito na regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e também redução dos níveis de colesterol (MACEDO et al., 2008). Outra funcionalidade do mel é o de agregar sabor, devido às características de doçura e sabor peculiares.

Tendo em vista os benefícios que o kefir e o mel podem promover à saúde, há necessidade de estudos que tornem viável a combinação desses alimentos, além de estudar a viabilidade dos microrganismos presentes no kefir combinado com mel e a resistência destes à passagem pelo trato gastrointestinal.

2. BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E COLONIZAÇÃO INTESTINAL

O termo probiótico, que significa para vida, designa bactérias que apresentam efeitos benéficos tanto para seres humanos como para animais. As primeiras observações acerca dos benefícios intestinais dos probióticos, foram atribuídos ao russo Eli Metchnikoff, com trabalhos realizados no Instituto Pasteur em 1907, que sugeriu a possibilidade de adoção de medidas capazes de substituir microrganismos intestinais nocivos por benéficos (FAO/WHO, 2001).

A definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e pela World Health Organization (WHO) as quais os definem como microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

A legislação brasileira define que as bactérias aprovadas para utilização como probióticos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis, Bifidobacterium animallis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008), portanto o kefir contém alguns microrganismos considerados probióticos.

Alguns critérios deverão ser seguidos para a seleção de bactérias probióticas como gênero; origem (deverá ser humana); estabilidade em relação à passagem pelo ambiente ácido do estômago e ao contato com sais biliares; capacidade de adesão à mucosa intestinal; capacidade de colonização do intestino, mesmo que esta seja passageira; inibição de patógenos (RAIZEL et al., 2011) e ainda apresentar atividade metabólica,

como síntese de ácidos graxos de cadeia curta, produção de vitaminas e substratos energéticos (PEREZ; MENEZES; D'ACÂMPORA, 2014).

A utilização de culturas bacterianas probióticas reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, uma vez que elas estimulam a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento das potencialmente prejudiciais, além de inibirem a multiplicação de patógenos (MACEDO et al., 2008).

Aos probióticos são atribuídos três possíveis mecanismos de atuação. O primeiro diz respeito à supressão de células viáveis por meio de produção de compostos que apresentam atividade antimicrobiana, competição pelos nutrientes e também por sítios de adesão. O segundo mecanismo trata de uma possível alteração do metabolismo microbiano, por intermédio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro mecanismo de ação seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e aumento da atividade dos macrófagos (SAAD, 2006).

Em relação a resposta imune, os efeitos dos probióticos ocorrem por meio da mediação de macrófagos, por elevação nos níveis de citocinas, aumento da atividade das células *natural killer* (NK) e/ou aumento nos níveis de imunoglobulinas. É importante ressaltar que todos estes benefícios dos probióticos perante o sistema imunológico ocorrem sem que haja desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (OLIVEIRA, 2009).

Como exemplo dos principais mecanismos de ação atribuídos aos probióticos encontram-se: 1 – Atividade antimicrobiana por meio da diminuição do pH luminal, secreção de substâncias antimicrobianas e bloqueio da adesão bacteriana às células epiteliais; 2 – Função de barreira por meio do aumento na produção de muco, o que melhora a integridade da barreira; 3 – Imunomodulação através do efeito nas células epiteliais, nas células dentríticas, nos monócitos e macrófagos e nos linfócitos (COSTA et al., 2013).

Efeitos benéficos têm sido atribuídos aos probióticos, sobretudo a capacidade de adesão à superfície de mucosas e às células epiteliais, prevenindo a instalação de microrganismos potencialmente patogênicos (MAKINO et al., 2014).

O trato gastrointestinal (TGI) humano é densamente povoado por micro-organismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também são encontrados fungos, archaea e vírus. Abriga dez vezes mais bactérias que o número de células que

formam nosso organismo. A composição bacteriana dos indivíduos é distinta, tendo influência genética bem como características individuais e ambientais, como: tipo de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares. O tipo de alimentação pós–natal apresenta grande impacto na composição da microbiota intestinal dos indivíduos. Os lactentes apresentam maior variabilidade da composição microbiana quando comparado à microbiota intestinal adulta, abrigando menos espécies com menor estabilidade. Por volta do 2º e 3º ano de idade, a microbiota passa a ser estável, podendo ser comparável a de um adulto. Ao longo da vida, a microbiota intestinal passará por várias mudanças, decorrentes do meio ambiente, estilo de vida e alimentação, patologias e envelhecimento (MORAES et al., 2014; PEREZ; MENEZES; D'ACÂMPORA, 2014).

A multiplicação das espécies bacterianas ao longo do TGI é heterogênea, sendo menor no estômago e intestino delgado devido à ação bactericida do suco gástrico, da bile, secreção do pâncreas e peristaltismo intenso do intestino. No cólon, concentra-se a maior parte da microbiota, fato que se deve à ausência de secreção enzimática e oferta de nutrientes aliados ao baixo peristaltismo. A capacidade de adesão aos receptores da mucosa intestinal é o fator predominante para a colonização das bactérias no trato gastrointestinal. É possível que microrganismos pioneiros exerçam um papel fundamental na seleção da microbiota, impedindo o crescimento de outros microrganismos. Após a adesão à mucosa intestinal, os microrganismos estabelecem colônias permanentes, constituindo a microbiota autóctone que, torna-se cada vez mais estável a partir do amadurecimento da relação simbiótica com o hospedeiro. Microrganismos introduzidos posteriormente podem associar-se à mucosa, porém sem adesão a receptores, constituindo a microbiota alóctone (LEITE et al., 2014).

Apenas espécies bacterianas dominantes (entre 10^9 e 10^{11} UFC/g) e subdominantes (10^6 e 10^8 UFC/g) estão presentes em quantidades suficientes para desempenharem uma função no hospedeiro. Os principais benefícios da microbiota podem ser divididos em três níveis: 1- escudo biológico: função de barreira ativa contra patógenos; 2 -atividade trófica: estímulo à angiogênese, ao sistema imune local e sistêmico; 3 -metabólicas: fermentação de alimentos que não foram absorvidos, matéria orgânica advinda do próprio hospedeiro, como por exemplo, células descamadas de epitélios e secreções, e metabólitos produzidos pela microbiota, ocasionando a produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas (K, B12, folato, biotina, riboflavina) e

carotenoides, substratos energéticos como ácido butírico, propiônico e acético para o consumo de colonócitos, hepatócitos e tecidos periféricos, respectivamente (PEREZ; MENEZES; D'ACÂMPORA, 2014).

O intestino humano é colonizado por inúmeras estirpes de bactérias, a maioria anaeróbias estritas. A microbiota intestinal influencia as reações bioquímicas que ocorrem no hospedeiro. Se a microbiota encontra-se íntegra e em equilíbrio, impede a ação de microrganismos patogênicos, porém, os mesmos exercerão patogenicidade com consequente infecção caso haja desequilíbrio na microbiota.

Embora a ausência ou a presença de uma matriz alimentar possa determinar o perfil de pH ao qual a estirpe probiótica está sujeita e apesar das condições de acidez inicial serem menos rigorosas, devido ao efeito protetor inicial de pH conferido pelos alimentos, uma digestão mais demorada no estômago pode expor o probiótico a um ambiente mais ácido por um período mais longo. A presença dos sais biliares induz a propriedades que afetam as membranas dos microrganismos, em decorrência da sua natureza antifílica (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Comumente no intestino humano são encontrados microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo encontrados também em produtos lácteos fermentados e suplementos alimentares (OLIVEIRA, 2009).

As bifidobactérias são microrganismos Gram positivos e não formadores de esporos. Neste gênero estão incluídas 30 espécies, sendo 10 de origem humana, encontrada nas fezes, cáries dentárias e vagina. As de origem animal contabilizam 17, duas têm sua origem em águas residuais e uma origina-se do leite fermentado. Ao contrario do que ocorre com a maior parte das bactérias deste gênero, a que tem origem no leite fermentado apresenta boa tolerância ao oxigênio. As bifidobactérias são microrganismos que sintetizam ácido acético e ácido lático na proporção de 3:2, a partir de dois moles de hexose, não havendo produção de CO_2. Todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar, além da glicose, a galactose, lactose e a frutose como fontes de carbono. A temperatura ótima de crescimento está entre 37 e 41ºC, com pH ideal entre 6 e 7 (RAIZEL et al., 2011).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, são caracterizados como Gram positivos, não formadores de esporos, sem flagelos, apresentando-se na forma de

bastonetes ou cocobacilos. Podem ser anaeróbios ou aerotolerantes (SANTOS; BARBOSA; BARBOSA, 2011).

As bactérias deste gênero são amplamente distribuídas, sendo encontradas por todo sistema gastrointestinal e geniturinário, tendo grande relevância na microbiota de homens e animais. Sua distribuição pode sofrer interferência por vários fatores ambientais, tais como: pH, disponibilidade de oxigênio, concentração do substrato especifico, presença de secreções e interações bacterianas. *L. acidophillus* apresenta baixa tolerância à salinidade do meio, e é um microrganismo microaerofílico, sendo que o crescimento em meios sólidos é favorecido pela ausência de oxigênio (anaerobiose), ou pressão reduzida de oxigênio. São capazes de degradar amidalina, celobiose, frutose, galactose, lactose, glicose, maltose e manose. A partir da degradação de glicose, produz quase que exclusivamente ácido lático e uma pequena quantidade de acetaldeído. A temperatura ótima de crescimento está em torno de 35 e 40ºC. Em relação a acidez do meio, sua tolerância varia entre 0,3 e 1,9% (v/v) de ácido lático (RAIZEL et al., 2011).

É essencial a manutenção da microbiota intestinal, seja por suplementação de probióticos, prebióticos ou simbióticos, tendo em vista que o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro é possível graças ao microecossistema que compõe o trato gastrointestinal (OLIVEIRA, 2009). Além disso, Vandenplas, Huys e Daube (2015) reportaram que os probióticos apresentam a importância não apenas em relação ao trato gastrointestinal, mas também a outros órgãos como boca, pele e trato urogenital, prevenção de infecções do trato reprodutivo e urinário.

Leão et al. (2015) avaliaram a influência de *L. rhamnosus* na expressão de fatores de virulência de *Candidaalbicans in vitro* e observaram significativa redução no crescimento dessa levedura após 24, 48 ou 72 horas na presença de lactobacilos em comparação ao crescimento na ausência desses microrganismos, verificado em condições tanto de anaerobiose como de microaerofilia. Tais resultados promoveram uma dificuldade de recuperação de *Candida* para os ensaios subsequentes da investigação dos fatores de virulência. Ressalta-se ter sido realizado estudo *in vitro*, sendo que condições *in vivo* são mais dinâmicas havendo interferência de outras espécies e também do sistema imune do hospedeiro.

Os probióticos também apresentam eficácia na prevenção da diarreia causada por bactérias patogênicas e por vírus. Os efeitos benéficos foram comprovados utilizando-se

L. rhamnosus GG e *Bifidobacteriumlactis* BB-12 para a prevenção e tratamento da diarreia aguda em crianças, causada principalmente, por rotavírus (FAO/WHO, 2001).

É importante ressaltar também que a administração de probióticos não se limita apenas na forma de alimentos ou suplementos farmacêuticos. Pomadas específicas e sprays nasais têm sido desenvolvidos, o que demonstra a importância de ampliação do controle das alegações, não se restringindo apenas aos alimentos (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

3. KEFIR: DEFINIÇÃO, COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

Kefir constitui-se de um agregado de microrganismos simbióticos, dentre eles, bactérias acidófilas e leveduras, que podem promover diversos benefícios à saúde (SANTOS; BASSO, 2013). Dertli e Çon (2017) ao avaliarem quatro amostras de kefir, constataram que bactérias do gênero *Lactobacillus* foram as predominantes. As bactérias ácido láticas (BAL) desempenham um papel importante na conversão do leite em produtos lácteos fermentados. Nesse sentido suas propriedades mais importantes são a de acidificar o leite, gerando sabor e textura característicos (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISIANTOSA, 2014). Em relação às leveduras, *Kluyveromyces marxianus* contribui para as principais características do kefir tais como a sua estabilidade microbiana, propriedades químicas, sensoriais e estruturais dos grãos de kefir (CHO et al., 2018).

Foi comprovado que *K. marxianus* e *Saccharomyces cerevisae* isolados de kefir são capazes de resistir às condições ácidas e aos sais biliares do trato gastrointestinal (simuladas *in vitro*), apresentando taxa de sobrevivência de 50 e 90%, respectivamente (CHO et al., 2018).

A Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), menciona que os grãos de kefir compõem-se por leveduras fermentadoras de lactose e também pelas não fermentadoras, respectivamente *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisae, Saccharomyces exiguus*. Também fazem parte da constituição dos grãos, *Lactobacillus casei, Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007).

O número total de microrganismos do kefir e sua composição é variável,

dependendo da origem, dos métodos de cultura e do substrato utilizado (MOREIRA et al., 2008; WESCHHENFELDER et al., 2011). A microbiota dos grãos de kefir não é distribuída uniformemente, sendo que no seu interior há uma maior diversidade de microrganismos quando comparado com o exterior (HAMET et al., 2013).

Uma característica que difere o kefir de outros produtos lácteos fermentados é a possibilidade de recuperação dos grãos após a fermentação com um leve acréscimo no bioma dos grãos (SATIR; ZEYNEP B.; GUZEL-SEYDIM, 2016).

No Brasil, kefir é utilizado como um produto da medicina popular, devido aos efeitos benéficos conferidos ao produto obtido a partir da sua fermentação. Os meios de cultivo do kefir podem variar, podendo a cultura ser realizada no leite, açúcar mascavo ou suco de fruta. A coloração dos grãos obterá tonalidades diferentes, de acordo com o meio onde se deu o cultivo. Quando os grãos forem cultivados no leite, apresentarão tonalidade amarela, ocres e pardos se cultivados no açúcar mascavo e ainda coloração púrpura quando cultivados no suco de uva (MOREIRA et al., 2008).

O produto obtido a partir da fermentação do kefir constitui-se de uma solução ácida, contendo etanol, gás carbônico e compostos aromáticos (DINIZ et al., 2003; LEITE et al., 2013). São constituintes também da bebida produzida a partir dos grãos, ácidos lático, fórmico, succínico e propiônico, aldeídos, traços de álcool isoamílico e acetona. São encontrados ainda, uma variedade de folatos (SANTOS; BASSO, 2013).

Os grãos de kefir encontram-se encapsulados por uma matriz de polissacarídeos, os quais são secretados pelas bactérias ácido-láticas (DINIZ et al., 2003). Esses polissacarídeos são conhecidos como quefirano, ou fator de crescimento kefir – KGF. Este composto é parcialmente solúvel em água. Fazem parte de sua composição os monossacarídeos galactose e glicose (MOREIRA et al., 2008). O quefirano apresenta quantidades iguais de glicose e galactose (DAILIN et al., 2016), além de apresentar vários efeitos benéficos à saúde.

Estudo realizado por Jeong et al. (2017) isolou estirpes de bactérias do ácido lático, das quais, oito estirpes eram de *Lactobacillus kefiranofaciens*, duas estirpes eram de *Lactobacillus kefiri*, sete estirpes eram de *Lactococcus lactis* e cinco estirpes de *Leuconostoc mesenteroides*, com o objetivo de avaliar qual estirpe produzia a maior quantidade de exopolissacarídeo (EPS) kefirano. Além disso, os autores objetivaram isolá-lo e avaliar sua atividade antimicrobiana contra dois importantes patógenos, *Listeria*

monocytogenes e *Salmonella enteritidis*. A partir do DNA das bactérias isoladas, sequências parciais do RNA ribossômico 16S foram amplificadas. Para avaliar a produção de EPS pelas estirpes isoladas, tomaram como base a característica das colônias; formação de cápsulas dependentes de fontes de carbono e rendimento de EPS em caldo MRS. Eles concluíram que *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 era a estirpe com maior produção de EPS (EPS_DN1) e que a uma concentração de 1%, houve efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*. Concluíram ainda que o EPS_DN1 não é kefirano, sugerindo então, que se trata de um novo composto bioativo presente no kefir.

Hamet et al. (2013) relataram ainda que o quefirano apresenta atividade imunomoduladora de proteção das células epiteliais da ação de *Bacillus cereus*. Outras propriedades terapêuticas são atribuídas ao kefir, como diminuição dos efeitos da intolerância à lactose, imunomodulação, efeitos antimicrobianos, atividade anticarcinogênica e também regeneração hepática (SANTOS et al*.,* 2012).

Em estudo realizado com ratos, com hipertensão induzida, observou-se a supressão do aumento da pressão sanguínea após 30 dias de tratamento com quefirano. Verificou-se atividade sobre a produção de β-interferon, cortisol e noradrenalina, o que possibilitou a redução do estresse, atividade antitumoral e antimicrobiana (MOREIRA et al*.,* 2008).

Diniz et al. (2003) realizaram estudo *in vivo* para avaliar a possível atividade anti-inflamatória do kefir por meio de indução de tecido granulomatoso e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Foram utilizados ratos da raça Wistar e camundongos albinos, ambos machos. Por meio do método de indução de tecido granulomatoso foi possível avaliar se haveria atividade anti-inflamatória sobre processos crônicos. Para o cultivo do kefir utilizou-se como substrato açúcar mascavo diluído em água mineral. Constatou-se que a administração de 1mL de kefir diariamente, durante seis dias, foi capaz de inibir a formação de tecido granulomatoso em 42% em comparação ao grupo controle. A inibição por dexametasona de aplicação tópica foi de 51%. A indução de contorções abdominais por ácido acético, resulta na produção de prostaglandinas, principalmente PGE_2 α e PGF_2 α, as quais são mediadores essenciais no processo inflamatório. Acredita-se que a inibição destas contorções possa estar envolvida com a inibição da formação das prostaglandinas, tendo atividade sobre os processos

inflamatórios. O grupo de ratos e camundongos que recebeu o kefir como parte do tratamento apresentou inibição de 28% e a inibição relativa à indometacina representou 36% quando comparado ao controle. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o kefir possui atividade anti-inflamatória.

Kim et al. (2017), a fim de avaliarem os efeitos do kefir sobre a obesidade e esteatose hepática em ratos alimentados com dieta rica em lipídeos (60% do total de calorias), verificaram que o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica associada ao consumo de kefir (0,2 mL duas vezes ao dia) teve um ganho de peso menor quando comparado ao grupo controle, o qual recebeu a dieta hiperlipídica e leite (0,2 mL duas vezes ao dia). Em relação ao colesterol total e ao LDLc, verificaram que o grupo que recebeu kefir apresentou níveis plasmáticos mais baixos comparando-se ao controle. Os autores não encontraram difrenças significativas entre os dois grupos nas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, IL-1β e TNF-α. Porém em relação à IL-6, o grupo do kefir apresentou níveis plasmáticos mais baixos, sugerindo uma melhora da inflamação sistêmica promovida pela dieta hiperlipídica.

Já Fernandes et al. (2017) avaliaram os teores de isoflavonas e compostos fenólicos presentes no leite de soja fermentado com kefir após armazenamento e simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Para obtenção do extrato, 250g de soja foram maceradas em 300 mL de água, ficando sob armazenamento a 5 ºC durante 15 horas. Kefir liofilizado foi inoculado no extrato de soja a 25 ºC, fermentando durante 15 horas, sendo em seguida mantido sob refrigeração a 4 ºC, em frascos estéreis, durante quatro dias. Os autores verificaram que a fermentação proporcionou aumento das bactérias ácido láticas e que as leveduras permaneceram viáveis durante todo o período de armazenamento. No entanto, após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, a contagem padrão em placas de microrganismos foi inferior a 6 log UFC/g. Quanto às isoflavonas a aos compostos fenólicos, verificaram que os mesmos aumentaram, mesmo após o teste *in vitro*.

Fiorda et al. (2016) avaliaram diferentes tipos de substratos funcionais com o objetivo de desenvolver bebidas probióticas utilizando kefir como cultura inicial. Os substratos analisados foram a soja, o colostro (bovino) e o mel. Da soja, foi obtido o extrato. Já o mel foi diluído em água estéril até que fosse obtido um mosto de 40°Brix e o colostro foi coletado nas primeiras 12 horas pós-parto. Foram utilizados kefir tibetano

(cultivados em leite) e kefirmexicano (cultivados em acúcar). Kefir tibetano foi inoculado no extrato de soja e colostro, e kefir mexicano foi inoculado no mel, deixando-se fermentar por 24 horas a 30°C. Foram analisadas as características físico-químicas, características funcionais e sensorias das bebidas. Após análises, foi constatado que o kefir melhorou a qualidade funcional de todos os substratos avaliados. No entanto, a bebida à base de mel apresentou maior poder antioxidante, apresentando proteção aos danos do DNA. Em relação à análise sensorial, a bebida à base de mel apresentou melhor aceitação comparando-se ao cultivo tradicional no açúcar mascavo. Os autores concluíram que o mel seria o substrato ideal para produção de bebida fermentada, com alto poder antioxidante, baixos teores de lactose e boa composição de microrganismos probióticos.

Estudo realizado por Weschenfelder et al. (2011) avaliou características físico-químicas e composição centesimal (Tabela 1) do kefir.

Tabela 1. Características físico-químicas e composição centesimal de kefir.

Componentes	Valores
pH	3,60
Acidez (°D)	141,95
Umidade (%)	79,39
Proteína (%)	9,23
Gordura (%)	8,29
Cinzas (%)	0,89
Cálcio (%)	0,11
Lactose (%)	ausência

Fonte: Weschenfelder et al. (2011).

3.1. Características nutricionais de kefir

O valor nutricional de um leite fermentado depende da disponibilidade e da digestibilidade de nutrientes e das alterações decorrentes da fermentação e crescimento microbiano. Geralmente, o valor energético do leite fermentado é similar ao do leite em que foi preparado (KHEDKAR; KALYANKAR; DEOSARKAR, 2016).

Dentre as características nutricionais encontradas no kefir, é importante salientar que este apresenta boa digestibilidade e é considerado a melhor fonte natural de

probióticos (SATIR; ZEYNEP; GUZEL-SEYDIM, 2016). Recentes descobertas confirmaram que kefir foi capaz de digerir β e α- caseína, porém não hidrolisou a β-lactoglobulina, mesmo com tempo prolongado de fermentação. A maior digestibilidade no kefir poderia melhorar a saúde intestinal por limitar a produção de metabólitos inflamatórios por bactérias putrefativas no cólon (DALLAS et al., 2016).

Kefir contém aminoácidos essenciais, vitaminas (B1, B2, B5, C, A, K e carotenos) e minerais. É importante destacar que a composição vitamínica de kefir é influenciada pelo tipo de leite e também pela microbiota dos grãos (ARSLAN, 2015).

Satir, Zeynep e Guzel-Seydim (2016) afirmaram que o tipo de manejo nutricional ao qual a espécie animal (bovina ou caprina) é submetida também exerce influência nas características nutricionais do kefir. Eles destacaram que kefir produzido do leite de animais mantidos sob o sistema de alimentação extensiva apresentaram parâmetros nutricionais melhores quando comparados com kefir produzido a partir do leite de animais mantidos sob o sistema de alimentação intensiva. Componentes nutricionalmente benéficos estavam presentes em níveis significativamente superiores em kefir produzidos de leite de animais mantidos sob manejo à pasto em comparação a um sistema de alimentação intensivo.

O perfil aminoacídico de kefir (Tabela 2) sofre alterações durante a fermentação do leite, sendo maiores os níveis de treonina, lisina, serina e alanina (ARSLAN, 2015). Dallas et al. (2016) demonstraram que peptídeos funcionais são liberados pela hidrólise de proteínas pelos microrganismos de kefir, podendo melhorar a funcionalidade do produto.

Tabela 2. Perfil de aminoácidos essenciais presentes no kefir.

Aminoácidos	Quantidade no kefir (mg/100 g)
Valina	220
Isoleucina	262
Metionina	137
Lisina	376
Treonina	183
Fenilalanina	231
Triptofano	70

Fonte: Arslan (2015).

Além de macroelementos, microelementos são encontrados nos grãos de kefir. Este também é uma boa fonte de cálcio, magnésio e fósforo (Tabela 3). O fósforo é o segundo mineral em maior quantidade no corpo humano. Suas funções no organismo são auxiliar na utilização de carboidratos, proteínas e gorduras para o crescimento celular, manutenção e energia.

Tabela 3. Macro e micro elementos presentes nos grãos de Kefir.

Macro elementos	Valores encontrados (%)	Micro elementos	Valores encontrados (mg/kg)
Potássio	1,65	Cobre	7,32
Cálcio	0,86	Zinco	92,7
Fósforo	1,45	Ferro	20,3
Magnésio	0,3	Manganês	13,0
		Cobalto	0,16
		Molibdênio	0,33

Fonte: Arslan, (2015).

Estudo conduzido por Satir, Zeynep B. e Guzel-Seydim (2016) avaliaram como a fermentação do kefir poderia afetar a composição do produto e correlacionaram os valores de algumas vitaminas e minerais encontrados no kefir produzido a partir de leite de cabra com os valores da *recommended dietary allowances* (RDA). Os autores verificaram que o consumo de 1 copo de 200 mL de kefir supriria, em relação ao percentual da RDA, os seguintes valores de recomendação: 15% de vitamina A; 30% de vitamina B2; 23% de cálcio; 33% de fósforo e 14% de zinco.

4. PREBIÓTICOS

Prebióticos são definidos como componentes alimentares não digeríveis, capazes de estimular seletivamente a multiplicação ou atividade das bactérias desejáveis no intestino (MACEDO et al., 2008; MONA et al., 2015) conferindo efeitos benéficos ao hospedeiro, devido à sua capacidade em estimular o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias, usualmente lactobacilos e bifidobactérias (MONA et al., 2015).

A maior frequência de atuação dos prebióticos é no intestino grosso, embora possam apresentar certo impacto sobre os microrganismos encontrados no intestino delgado (OLIVEIRA, 2009). Para que um alimento possa ser classificado como prebiótico, precisa ser carboidrato e atender aos seguintes critérios: não sofrer hidrólise ou ser absorvido no trato intestinal e que sua fermentação se dê por um número limitado de microrganismos, como pelas bifidobactérias e pelos lactobacilos (COSTA et al*.,* 2013). São considerados prebióticos: inulina (frutanos), frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e também a lactulose, álcoois de açúcar, amido resistente e polissacarídeos complexos, como por exemplo a goma de acácia. Muitos substratos não digeríveis, especialmente os carboidratos, são fermentados no intestino grosso (SCHOLZ-AHRENS et al*.,* 2016).

A associação entre probiótico e prebiótico origina os produtos denominados simbióticos. A interação *in vivo* entre probiótico e prebiótico pode ser favorecida através de uma adaptação, anterior ao consumo, do probiótico ao substrato prebiótico. Tal adaptação pode resultar em vantagem competitiva para o probiótico, caso este seja consumido juntamente com o prebiótico. Esse efeito simbiótico pode ser, alternativamente, direcionado ao intestino delgado e grosso, regiões alvo do trato gastrointestinal. O estímulo de estirpes probióticas conhecidas, propicia a escolha dos pares simbióticos substrato–microrganismo ideais. Portanto, o consumo de pro e prebióticos selecionados apropriadamente, pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles (OLIVEIRA, 2009). A combinação entre um prebiótico especifico e um probiótico, exerce um efeito benéfico que vai além do seu efeito individual, o que se presume ocorrer através da otimização da sobrevivência e atividade de microrganismos benéficos no trato gastrointestinal (SCHOLZ-AHRENS et al*.,* 2016). No entanto, Vandenplas, Huys e Daube (2015) relataram que após um tratamento com probióticos e prebióticos, simultaneamente, por meio de uma mistura de quatro estirpes e galactoligossacarídeos, realizado com gestantes por duas a quatro semanas pré-parto e aos neonatos durante seis meses, não obteve efeito, comparado ao placebo, sobre a incidência acumulada de doenças alérgicas aos dois anos. Todavia, mostrou uma tendência na diminuição das doenças relacionadas à IgE (atópica), por ter sido observada uma diminuição significativa do eczema (atópico).

Estudos mostram que a administração de prebióticos aumenta a microbiota intestinal benéfica do indivíduo, em particular, as bifidobactérias. Além de contribuir para

elevação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e diminuição nos níveis das citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em diminuição da inflamação intestinal em idosos (PATEL et al., 2014).

A inulina, um frutooligossacarídeo não digerível, comumente extraída da raiz de chicória, é considerada um prebiótico por ter a capacidade de elevar o número de probióticos no cólon (MAESTRI et al., 2014). Os FOS podem ser extraídos de vegetais como alcachofra, raiz da chicória, dália, alho, cebola, dente de leão, banana, dentre outros. Embora a quantidade existente nestes alimentos seja pequena e, em contrapartida, a quantidade exigida para se obter efeito funcional seja elevada, os FOS podem ser extraídos e concentrados (THAMER; PENNA, 2005).

Há um consenso de que os FOS alteram o habitat intestinal, promovendo aumento no bolo fecal e em consequência a normalização da frequência fecal. Seus efeitos prebióticos são percebidos com o aumento no número e atividade de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas no intestino humano. Em função disso, os FOS assumem importância tecnológica por serem utilizados na fabricação de uma grande variedade de alimentos como, por exemplo, iogurte, queijo, leite, extrato de soja, cereais, dentre outros (THAMER; PENNA, 2005).

Tem sido demonstrado que prebióticos e simbióticos podem aumentar a absorção de minerais, especialmente de cálcio e magnésio. Os mecanismos relacionados são: maior solubilidade dos minerais, decorrente do aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bactérias, devido à maior oferta de substrato; alargamento da superfície de absorção em razão da multiplicação de enterócitos, mediados pelos produtos da fermentação bacteriana, em especial, lactato e butirato; maior expressão das proteínas de ligação de cálcio; melhoria das condições intestinais; degradação de mineral complexante de ácido fítico; estabilização da microbiota intestinal (PATEL et al., 2014).

O metabolismo e composição dos prebióticos são diferentes embora possuam mecanismos de atuação em comum, especialmente no que diz respeito à modulação da microbiota endógena. Enquanto não sofrem fermentação, os prebióticos exercem um efeito osmótico no trato gastrointestinal, como todo carboidrato não digerível.

A inulina e a oligofrutose apresentam resistência à digestão na parte superior do trato intestinal, sofrendo fermentação ao chegarem no cólon. A fermentação promove um aumento na biomassa microbiana, em conseqüência, aumento de volume, promovendo

um aumento na freqüência das evacuações. Tais efeitos justificam sua classificação como fibras dietéticas (SAAD, 2006).

4.1. Mel: composição e propriedades funcionais

A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define mel como produto alimentício produzido por abelhas melíferas, obtido do néctar das flores ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, as quais são recolhidas pelas abelhas, que transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O mel é considerado um alimento funcional por exerecer função prebiótica, tendo como efeitos a regulação do trânsito intestinal, controle da pressão arterial, diminuição do risco de câncer e redução da colesterolemia (MACEDO et al., 2008). Por apresentar doçura e sabor característico, o mel agrega sabor à bebida quando adicionado, tendo em vista que é composto de uma solução concentrada de açúcares, predominantemente glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas e grãos de pólen, e pode conter cera de abelhas proveniente do processo de extração. A produção de ácido é favorecida na presença do mel, por conter alto teor de carboidratos fermentáveis (GOIS et al., 2013).

Além de ser utilizado como prebiótico, o mel possui outros benefícios. Em estudos realizados por Silva et al. (2014), foi verificado e comprovado o efeito antioxidante do mel, por meio da análise do perfil de compostos fenólicos e também da atividade sequestradora de radical livre do mel. Foram identificadas e quantificadas as substâncias 4-quinolona, ácido (2E, 4E)-abscísico e ácido (2Z, 4E)-abscísico.

O mel contém tipos e níveis mínimos de microrganismos. A eles são atribuídas as propriedades naturais e também o controle realizado pela indústria, geralmente relacionado à fatores físicos e químicos, tais como osmolaridade e concentração de peróxido de hidrogênio e voláteis, respectivamente. Compostos fenólicos e a enzima glicose oxidase presentes no mel proporcionam uma barreira ao desenvolvimento de

microrganismos em razão da forte característica oxidante destes compostos. A quantidade de bactérias presentes no mel pode variar de acordo com os seguintes fatores: tipo de mel; idade; tempo de colheita e a técnica de análise empregada (GOIS et al., 2013).

Mercês et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do mel produzido por diferentes espécies de abelhas e verificaram que todos os tipos de mel avaliados apresentaram ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. O método de análise utilizado foi o teste de difusão em poço. O estudo sugere que o efeito de inibição de crescimento bacteriano não está relacionado somente ao efeito osmótico, visto que o mel foi mais efetivo contra as bactérias do que uma solução de açúcar.

Além disso, Santos et al. (2012) avaliaram a eficácia do mel na cicatrização de feridas em ratos da raça Abissínia. Com o estudo, os pesquisadores puderam comprovar que o mel apresenta ação cicatrizante, estimulando a formação de tecido de granulação e reepitelização.

Algumas características apresentadas pelo mel o tornam eficaz contra alguns microrganismos, como por exemplo alta pressão osmótica (85-95% de açúcar), baixa atividade de água, pH baixo devido à presença de ácidos orgânicos, especialmente ácido glucônico, presença de peróxido de hidrogênio (ação da enzima glicose oxidase), baixo teor de proteínas, baixo potencial redox (presença de açúcares redutores), presença de agentes químicos, tais como, lisozima, ácidos fenólicos, pinocembrina, terpenos, álcool benzílico e substâncias voláteis (SILVA et al., 2017). O baixo pH do mel exerce um papel importante durante a armazenagem por influenciar sua estabilidade (SILVA et al., 2014).

As abelhas transformam o néctar em mel com o auxílio de algumas enzimas e, durante a produção, alguns microrganismos também são incorporados ao mel. A bactéria *Gluconobacter oxydans* foi isolada do mel mantendo-se viva no pH de 5,0 e no pH de 2,0 durante três horas, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 50%. Também se mostrou resistente à ação dos sais biliares. Desta forma, *Gluconobacter oxydans* é capaz de sobreviver ao ambiente hostil do trato digestivo superior, chegando ao intestino em condições de colonização (SILVA et al., 2017).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se verificar a qualidade microbiológica do kefir, pois condições inadequadas de manipulação afetaram a matéria-prima e o produto final.

A combinação kefir e mel é promissora pois o kefir contém microrganismos probióticos e o mel é considerado um alimento funcional por exerecer função prebiótica. O kefir acarreta benefícios à saúde como, melhora da intolerância à lactose, imunomodulação, inibição de microrganismos patogênicos e regulação da microbiota intestinal e o mel melhora a regulação do trânsito intestinal, controla da pressão arterial e reduz a colesterolemia.

Alguns estudos indicam que o kefir é capaz de colonizar o intestino humano, conferindo os efeitos benéfico esperados, no entatanto, faz-se necessário outras pesquisas com kefir, especificamente sobre seu comportamento no trato digestivo humano, já que não existem muitos estudos nesse sentido. Além disso, o Kefir é uma bebida de baixo custo, sendo uma alternativa saudável e eficaz para complementar a alimentação diária da população.

6. REFERÊNCIAS

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food,** v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de agosto de 2000. o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, outubro de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, abril de 2008.

CHO, Y-J.; KIM, D-H.; JEONG, D.; SEO, K-H.; JEONG, H. S.; LEE, H. G.; KIM, H. Characterization of yeasts isolated from kefir as a probiotic and its synergic interaction with the wine byproduct grape seed flour/extract. **LWT - Food Science and Technology**, v.90, p.535–539, 2018.

COSTA, M.P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. de B. P.; CRUZ, A. G. da; CONTE JÚNIOR, C. A. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera,** v.9, n.16, p.1387, 2013.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. de O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. 480p.

DAILIN, D.J.; ELSAYED, E. A.; OTHMAN, N. Z.; MALEK, R.; PHIN, H. S.; AZIZ, R.; W., MOHAMAD; ENSHASY, H. A. E. Bioprocess development for kefiran production by Lactobacillus kefiranofaciens in semi industrial scale bioreactor. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p. 495–502, 2016.

DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARILE, D. Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. **Food Chemistry**, v.197, p. 273–284, 2016.

DERTLI, E., ÇON, A.H. Microbial diversity of tradicional Kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT- Food Dcience and Technology**, v.85, p.151-157, 2017.

DINIZ, R.O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 19-21, 2003.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO\WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Londres, Ontário, Canadá: FAO/WHO, 2002. 11p.

FERNANDES, M. da S.; LIMA, F. S.; RODRIGUES, D.; HANDA, C.; GUELFI, M.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 373-380, 2017.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. de M.; SOCCOL, V. T.; MEDEIROS, A. P.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 690-697, 2016.

GOIS, G. C.; LIMA, C. A. B. de; SILVA, L. T. da; RODRIGUES, A. E. Composição do Mel de *Apis Mellifera*: Requisitos de Qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.137-147, 2013.

HAMET, M. F.; LONDERO, A.; MEDRANO, M.; VERCAMMEN, E.; HOORDE, K. V.; GARROTE, G. L.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; ABRAHAM, A. GApplication of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of Lactobacillus kefiranofaciens in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 36, p.327-334, 2013.

JEONG, D.; KIM, D. H.; KANG, II-B.; KIM, H.; SONG, K. Y.; KIM, H. S.; SEO, K.H. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v.78, p. 436-442, 2017.

KHEDKAR, C. D.; KALYANKAR, S. D.; DEOSARKAR, S. S. Fermented Foods: Fermented Milks. **Encyclopedia of Food and Health**. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00286-5. Acesso em: 20 mai. 2018.

KIM, D. H.; KIM, H.; JEONG, D.; KANG, II-B.; CHON, J. W.; KIM, H.S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 44, p. 35-43, 2017.

LEÃO, M. V. P.; SILVA, C. R. G. e.; SANTOS, S. S. E dos.; LEITE, P. G. C. *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 9, p. 417-420, 2015.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S. MIGUEL, M. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, 2013.

LEITE, L.; GULLÓN, B.; ROCHA, J.; KÜCKELHAUS, S. Papel da microbiota na manutenção da fisiologia gastrointestinal: uma revisão da literatura. **Boletim Informativo Geum,** v. 5, n. 2, p. 54-61, abr./jun.,2014.

MACEDO, L.N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C.G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MAESTRI, B.; HERERRA, L.; SILVA, N. K.; RIBEIRO, D. H. B.; CHAVES, A. C. S. D. Avaliação do impacto da adição de inulina e de maçã em leite fermentado probiótico concentrado. **Brazilian Journal of Food Technology,** v.17, n.1, p. 58-66, 2014.

MAKINO, L. E. dos S.; PERALTA, F. da S.; SCHERMA, A. P.; SILVA, C. R. G. e; LEÃO, M. V. P.; SANTOS, S. S. F. dos. Avaliação in vitro da influência de Lactobacillus casei na aderência de enterobacter cloacae em células epiteliais da mucosa jugal. **Brazilian Journal of Periodontology**, v. 24, n. 4, p. 15-21, 2014.

MERCÊS, M. D.; PERALTA, E. D.; UETANABARO, A.P. T.; LUCCHESE, A. M. Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.672-675, 2013.

MONA, M.H.; RIZK, E. S. T.; SALAMA, W. M.; YOUNIS, M. L. Efficacy of probiotics, and immunostimulant on growth performance and immunological parameters of *Procambarus clarkil juveniles*. **The Journal of Basic & Applied Zoology,** v.9, p.17-25, 2015.

MORAES, A. C. F. de.; SILVA, I. T. da.; ALMEIDA-PITITTO, B. de.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.58, n.4, p.317-27, 2014.

MOREIRA, M. E.C.; SANTOS, M. H.; PEREIRA, I. O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A.; SCHNEEDORF, J. M. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de kefir. **Química Nova,** v. 31, n. 7, 2008.

OLIVEIRA, A.L. O papel dos simbióticos na prevenção, tratamento e modulação da resposta inflamatória em pacientes com carcinoma colorretal. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais,** v.1, n.4, p.23-31, 2009.

PATEL, P. J.; SINGH, S. K.; PANAICH, S.; CARDOZO, L. The aginggutandthe role ofprebiotics, probioticsandsynbiotics: A review. **Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics,** v.5, p.3-6, 2014.

PEREZ, H. J.; MENEZES, M. E.; D'ACÂMPORA, A. J. Microbiota intestinal: Estado da arte. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, v.44, n.3, p.265-272, 2014.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. dos. Efeitos do consumo de probióticos, prebiótcos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde,** v.4, n.2, p.66-74, 2011.

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

SATIR, G.; ZEYNEP B.; GUZEL-SEYDIM. How kefir fermentation can affect product composition? **Small Ruminant Research**, v.134, p.1–7, 2016.

SANTOS, F.L.; SILVA, E.; SILVA, J.; BARBOSA, A.; SOUZA, A. C. Promoção do consumo de alimentos funcionais no recôncavo da Bahia: Estratégias de popularização do kefir. **Revista Extensão,** v.3, n.1, 2012.

SANTOS, I. F. C. dos; GROSSO, S. L. S.; BAMBO, O. B.; NHAMBIRRE, A. P.; CARDOSO, J. M. M.; SCHMIDT, E. M. dos S.; MARUJO, R. B. Mel e açúcar na cicatrização de feridas. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2219-2224, 2012.

SANTOS, M.R.; BASSO, C. Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de quefir. **Ciências da Saúde,** v.14, n.1, p.93-100, 2013.

SANTOS, R.B.; BARBOSA, L.P.J. de L.; BARBOSA, F.H.F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial,** v.1, n.2, 2011.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADOLPHI, B.; ROCHAT, F.; BARCLAY, D.V.; VRESE, M.; ACIL, Y.; SCHREZENMEIR, J. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats — impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. **NFS Journal**, v.3, p.41-50, 2016.

SILVA, M. S.; RABADZHIEV, Y.; ELLER, M. R.; ILIEV, I.; IVANOVA, I.; SANTANA, W. C. S. Microorganisms in Honey**. World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher**. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/honey-analysis. Acesso em: 02 mai. 2017.

SILVA, T. M. G. da; SILVA, P. R. da; CAMARA, C. A.; SILVA, G.S. da; SANTOS, F.A. R.; SILVA, T. M. S. Análises Químicas e Potencial Antioxidante do Mel de Angico Produzido pelas Abelhas Sem-Ferrão Jandaíra. **Revista Virtual de Quimica**, n.6, v.5, p.1370-1379, 2014.

THAMER, K.G.; PENNA, AL.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v.41, n.03, 2005.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: na update. **Jornal de Pediatra**, v.91, n.1, p.6-21, 2015.

WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT, R.; FEBRISIANTOSA, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p. 435-442, 2014.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.

CAPÍTULO 8 - EFEITO ANTIMICROBIANO DO KEFIR

Sebastião Moreira Júnior
Wharley Camargo Dias
Maria Paula Jensen Rodrigues
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

1. INTRODUÇÃO

A legislação brasileira define kefir como um leite fermentado resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado realizado com cultivos ácido láticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc, Lactococcus e Acetobacter*, com produção de ácido lático, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir apresentam em sua constituição uma simbiose microbiana composta por várias bactérias e leveduras, essenciais no desenvolvimento do fermentado (MACHADO et al., 2014). Dentre as leveduras, encontram-se as fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus, Saccharomyces cerevisiae e Saccharomyces exiguus, Lactobacillus casei, Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*) (BRASIL, 2007). Portanto, tanto os grãos de kefir quanto o leite fermentado pelos mesmos são denominados kefir.

Segundo Arslan (2015), o kefir é utilizado devido aos seus benefícios conferidos à saúde humana, é boa fonte de fósforo e seus grãos apresentam em sua estrutura aminoácidos essenciais, além possuírem vitaminas B1, B2, B5, C, A, K e carotenos, sendo que sua composição vitamínica é influenciada pelo tipo de leite e também pela microbiota presente nos grãos.

Autores afirmam que microrganismos presentes nos grãos de kefir formam uma barreira no intestino impedindo a multiplicação de patógenos, devido à produção de bacteriocinas, que são substâncias com propriedades antimicrobianas, que podem inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas (CAETANO; MONTANHINI, 2014; DIAS et al., 2012a).

O kefir vem sendo estudado pelo seu grande potencial no desenvolvimento de novos produtos, diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo trazer uma revisão relatando a origem e a forma de cultivo do kefir, bem como seus benefícios e seu efeito antagônico frente a microrganismos patogênicos.

2. KEFIR: DEFINIÇÃO, ORIGEM E CULTIVO

Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, formado pela ação de uma associação de bactérias e leveduras, as quais são encapsuladas em uma matriz polissacarídica chamada "kefiran", formando os grãos de kefir. Apresenta em sua composição água, lipídeos, proteínas, carboidratos e minerais, seus grãos possuem forma irregular, coloração amarelada e esbranquiçada, aparência semelhante à couve-flor, com diâmetro que varia de 0,3 a 3,5 cm (YOVANOUDI et al., 2013; MACHADO et al., 2014). É um mix complexo de bactérias e leveduras que se encontram em uma associação simbiótica, produzindo álcool ou ácido durante a fermentação (BAÚ et al., 2014).

Segundo Caetano e Montanhini (2014), o kefir é um produto caseiro, fermentado em temperatura ambiente, de difícil controle da temperatura, dificultando assim a padronização do produto. O produto obtido em temperaturas elevadas apresenta maior acidez do que o obtido em temperaturas mais baixas. O pH baixo representa um fator intrínseco inibitório para muitos microrganismos patogênicos. No entanto, produtos com um alto valor de acidez tendem a não atrair o paladar dos consumidores. Sua composição microbiana varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (MAGALHÃES et al., 2011).

Segundo Miguel et al. (2010), não se sabe ao certo a origem do kefir, podendo ter emergido de diferentes regiões, resultando em populações microbianas específicas e diferenciadas, que produzem bebidas com atributos microbiológicos e sensoriais discrepantes. Porém, Santos et al. (2012) relatam que o kefir é um produto originário da Rússia, mais especificamente das montanhas do Cáucaso.

A presença de uma microbiota diversificada torna-se a principal característica do kefir, unida pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras. As leveduras proporcionam características singulares ao produto tanto pelo aroma como pela síntese de vitaminas do complexo B e ainda pela produção de etanol e CO_2, mesmo após refrigeração (COSTA; ROSA, 2016).

O kefir não é comercializado no Brasil, sua produção é artesanal, em regiões específicas do país, para consumo próprio das famílias. Uma grande preocupação com o kefir é a sua origem de obtenção e a forma de manejo, não havendo um padrão de

qualidade para esse produto (JANUÁRIO, 2016).

Dois tipos de kefir são mais popularmente utilizados, o que são cultivados em água com sacarose como substrato e os que são cultivados no leite. Os grãos que utilizam o leite como substrato são compostos por um complexo heteropolissacarídeo, denominado kefirano, enquanto aqueles cultivados em água com açúcar mascavo são compostos por um complexo diferente, denominado dextrano (HSIEH et al., 2012). Como resultado do cultivo do kefir, tem-se um aumento da biomassa em uma faixa de 5% a 7% por dia. O aumento dos grãos é proveniente do crescimento dos microrganismos por meio da biossíntese dos componentes, sendo sua estrutura considerada um biofilme por apresentar diversificados microrganismos (MACHADO et al., 2014).

Em um estudo realizado por Zanirati (2012), foram identificadas as características das bactérias presentes no kefirano, por reação de cadeia da polimerase (PCR-ARDRA) de grãos de kefir de diferentes regiões do país. Tendo-se como resultados os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei, Lactobacillus kefir, Lactobacillus diolivorans, Lactobacillus perolens, Lactobacillus mali, Lactobacillus satsumensis e Lactobacillus parafarraginis*. Além disso, o DNA total extraído dos grãos de kefir foram submetidos à reação de PCR do gene 16S rRNA e foram identificadas as seguintes espécies*: Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus kefir, Lactobacillus satsumensis, Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus mali, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus nagelii, Lactobacillus casei, Oenococcus kitaharae, Oenococcus oeni, Enterobacter ludwigii e Klebsiella pneumoniae*, sendo também identificados dois microrganismos não cultiváveis.

3. PROPRIEDADES BENÉFICAS DO KEFIR

O kefir é rico em ácido lático, ácido acético, ácido glicólico, álcool etílico, vitamina B12 e polissacarídeos, que contribuem para suas características sensoriais (PIETTA; PIETTA; PALEZI, 2015). É um leite fermentado que pode promover diversos benefícios à saúde, como reparação da mucosa intestinal, redução dos sintomas de intolerância à lactose, estimulação do sistema imunológico, redução do colesterol e de propriedades tumorais e na dieta apresenta efeitos antibacterianos (MENESTRINA; GRISALES; CASTELL, 2016).

Em razão de suas propriedades funcionais, o kefir é um alimento que deve ser indicado para todos os indivíduos. Fiorda et al. (2016) relataram que o consumo da bebida kefir é limitado para os consumidores intolerantes à lactose, sendo substratos de origem não láctea, um modo alternativo para a ingestão desse produto.

São escassos os trabalhos que estudaram propriedades funcionais do kefir em seres humanos. Sabe-se que o mesmo pode equilibrar a microbiota intestinal nos indivíduos que os ingerem, já que essa é uma bebida funcional probiótica. Tendo em vista os benefícios que o kefir pode proporcionar à saúde e que este é cultivado e utilizado em ambiente doméstico, torna-se uma grande opção a busca e desenvolvimento de novas tecnologias que possam viabilizar a comercialização desse produto no mercado (SANTOS; BASSO, 2016).

Likotrafiti et al. (2015) demonstraram que o kefir tem potencial como probiótico, uma vez que as bactérias láticas presentes sejam resistentes aos ácidos biliares do trato gastrointestinal, além de possuir atividade antagonística frente a microrganismos patogênicos. Entretanto, segundo os autores, seus microrganismos são menos resistentes aos ácidos do que o ideal para um produto probiótico, sendo que essa resistência pode ser aumentada por meio da utilização de tecnologia de encapsulamento ou formulação cuidadosa do veículo alimentar. Os microrganismos presentes no kefir crescem bem aliados a uma gama de prebióticos, o que facilita o desenvolvimento de combinações de simbióticos.

Além disso, processo fermentativo gera uma série de compostos que conferem sabor e aroma característicos ao kefir, além de substâncias bioativas, responsáveis por propriedades nutracêuticas. A utilização de microrganismos com propriedades antimicrobianas como conservantes naturais é uma alternativa que tem como vantagem a inibição do desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas sem o uso de substâncias químicas (DIAS et al., 2012b).

Diniz et al. (2003) avaliaram a atividade antiinflamatória *in vivo* do kefir sobre modelo de indução de tecido granulomatoso e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados obtidos mostraram que o produto inibiu a formação do tecido granulomatoso, bem como o número de contorções abdominais causadas por ácido acético, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, pode-se sugerir uma possível ação antiinflamatória.

Romanin et al. (2010) avaliaram a atividade antiflamatória de 21 leveduras, isoladas do kefir e constataram que todos isolados apresentaram um valor de 100 % de eficiência para a inibição da inflamação no epitélio intestinal, dando ênfase em se estudar mais sobre as leveduras que fazem parte da microbiota do kefir.

Em uma avaliação do uso de kefir em dieta hospitalar Martins et al. (2012), concluíram que este produto tem um grande potencial para ser introduzido na dieta dos pacientes internados, uma vez que o incremento do kefir na dieta proporcionou inúmeros benefícios aos pacientes como estimulação do sistema imune, controle glicêmico, hipercolesterolêmico entre outros.

Dados de um teste *in vivo* demonstraram que as leveduras presentes no kefir de leite integral são mais resistentes às condições prevalecentes no trato gastrointestinal do que as bactérias do ácido lático. Quanto à atividade anticarcinogênica do kefir, identificou-se que o tratamento com o kefir foi capaz de reduzir em 36,7 % a incidência dos focos de criptas aberrantes no cólon dos animais tratados em comparação ao controle. Ainda, o kefir elevou a atividade da enzima antioxidante catalase no cólon e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes do ceco, além de abaixar a razão lactulose/manitol, ao final da fase de pós-indução do câncer. Com isso, o estudo mostrou que a atividade anticarcinogênica do kefir de leite integral se deve à redução da permeabilidade intestinal, ao aumento da atividade antioxidante, e ao aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta (REIS, 2015).

Rosa et al. (2017) relataram diversos benefícios de saúde do kefir, além de ser um alimento seguro e barato, facilmente produzido em casa. Os autores afirmaram que consumo regular de kefir foi associado a uma melhor digestão e tolerância à lactose, efeito antibacteriano, efeito hipocolesterolêmico, controle da glicose plasmática, efeito anti-hipertensivo, efeito anti-inflamatório, atividade antioxidante, atividade anti-carcinogênica, atividade antialergênica e de cicatrização. Sottoriva et al. (2018) apontaram que esses benefícios são devidos o principal polissacarídeo encontrado nos grãos de kefir que é o kefirano, um heteropolissacarídeo composto por proporções idênticas a de glicose e galactose e que possui propriedades antitumorais, antifúngicas, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.

3.1. Efeito antagônico do Kefir frente a patógenos

O kefir é produtor de substancias que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, frequentemente associadas a doenças de origem alimentar, entre elas o peróxido de hidrogênios e as bacteriocinas e até mesmo o pH da bebida, devido o processo de fermentação. O peróxido de hidrogênio é produzido por várias espécies de bactérias produtoras de ácidos lático e contribui para o efeito antagônico nos microrganismos patogênicos e, portanto, auxilia na preservação dos alimentos, a atividade antibactericida é atribuída devido seu efeito altamente oxidante através da peroxidação das membranas lipídicas e da destruição da estrutura molecular básica das proteínas celulares (MAGALHÃES et al., 2010).

As bacteriocinas são compostos proteicos, que possuem atividade letal em relação a outras bactérias (SANTOS et al., 2013). Os lactobacilos, amplamente presentes no kefir, podem atuar na degradação de proteínas produtoras de peptídeos devido sua ação bactericida, o que pode constituir um importante mecanismo na atividade antagônica aos microrganismos patogênicos (TAS; EKINCI; GUZEL-SEYDIM, 2012).

Dias et al. (2016) estudaram a atividade antimicrobiana de 60 microrganismos isolados de grãos de kefir por meio do teste do antagonismo e do teste de inibição com sobrenadantes contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli, Staphyloccocus aureus* e *L. monocytogenes*. O pH dos sobrenadantes foi verificado antes de testar a atividade antimicrobiana e o teste foi repetido após o tratamento com hidróxido de sódio (substância neutralizante) a fim de excluir a ação dos ácidos orgânicos. Alguns isolados apresentaram atividade antimicrobiana, demonstrando que a acidificação não é o único fator envolvido na inibição dos patógenos. Outros estudos relatam a atividade antimicrobiana do kefir frente a diferentes patógenos (Quadro 1).

O kefir, por meio dos microrganismos de sua estrutura e das substâncias bioativas produzidas com sua fermentação, torna-se uma alternativa viável na busca de substitutos para os antimicrobianos convencionais (DIAS et al., 2012a).

Quadro 1- Estudos que relatam a ação antagônica do Kefir frente a patógenos

Agente de ação antagônica	**Patógeno**	**Referência**
Kefir	*Salmonella* sp e *Shigella* sp	Murashova et al. (1997)
Isolados de kefir	*Salmonella typhimurium*	Tussolini et al. (2009); Raimundo (2013)
Isolados de kefir	*Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*	Dias et al. (2012a); Dias, Silva; Timm (2018)
Soro de leite fermentado com grãos de kefir	*Salmonella spp.*e *Escherichia coli*	Costa; Moura (2016)
Leite de ovelha por grãos de kefir	*Salmonella typhimurium*	Lima (2018)
cepas isoladas de kefir	*Escherichia coli*	Tussolini et al. (2009)
Kefir e o soro do produto	*Escherichia coli*	Weschenfelder et al. (2009)
Lactobacillus sp. isolados de grãos de kefir	*Escherichia coli* O157:H7	Dias; Silva; Timm (2018)
Kefir	*Escherichia coli*	Chamon (2018); Weschenfelder et al. (2018)
Kefir	*Staphylococcus aureus*	Ulusoy et al. (2007); Weschenfelder et al. (2018)
Cepas isoladas do grão de kefir	*Staphylococcus aureus*	Tussolini et al. (2009), Dias, Silva; Timm (2018)
Kefir	*Listeria monocytogenes*	Santos (2008)
Cepas de *Enterococcus durans* isolados de grãos de kefir	*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*.	Carasi et al. (2014)
Cepas isoladas de kefir	*Listeria monocytogenes*	Auad (2014)
Kefir	*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4)	Santos (2008)
Grãos de kefir	*Bacilus cereus* e *Clostridium perfringes*	Anselmo et al. (2010)
Kefir	*Bacillus cereus*	Santos et al. (2013)

Fonte: dos autores.

3.1.1. Ação antagônica frente à salmonela

O kefir pode ser utilizado no tratamento pós-operatório de pacientes com doenças gastrintestinais. Estudos observaram que crianças com infecção intestinal grave ao ingerirem kefir apresentaram rápida inibição de *Salmonella* sp e *Shigella* sp., no intervalo

de sete a onze dias da doença e a microbiota voltou ao normal. O grupo de crianças que não recebeu a bebida demorou um período maior para voltar a seu estado de normalidade (MURASHOVA et al., 1997).

Tussolini et al. (2009) avaliaram 20 isolados de kefir e destes, 85% apresentaram ação antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium*. Dentre estas cepas, a que apresentou maior atividade foi capaz de formar um halo de 1,92 mm.

Resultados semelhantes de inibição de *Salmonella typhimurium* por cepas de bactérias láticas isoladas de kefir também foram relatados por Dias et al. (2012a) que avaliaram se o kefir produzido de forma artesanal seria capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos veiculadas pelo leite. O estudo apontou que os microrganismos presentes nos grãos de kefir ao fermentar a matriz láctea resultaram em um ambiente inadequado para o desenvolvimento dos patógenos testados. *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* foram alguns dos microrganismos que após 24 horas de fermentação testaram negativo quanto a sua presença no alimento. Também testaram a sobrevivência destes mesmos patógenos frente à 60 microrganismos isolados dos grãos kefir, e observou dentro de um período de 6 á 8 horas de incubação e realizado a leitura de densidade ótica, teve-se como dados estatisticamente diferentes dos controles, que indicam atividade inibitória dos isolados.

A fermentação lática causada pelos grãos de kefir é capaz de gerar uma série de metabólitos que conferem características especificas à bebida e também substancias que apresentam efeitos antagonisticos (DIAS et al., 2016). Estudos realizados por Raimundo (2013) utilizando 10 isolados bacterianos e 3 isolados de leveduras de kefir que foram identificados por PCR-ARDRA, mostram que quase todos os isolados de lactobacilos demonstraram produção de substâncias antagonistas em testes *in vitro* e ao tratar camundongos com kefir por via oral, pôde-se observar a redução dos níveis de *Salmonella typhimurium* quando comparados aos que não foram tratados com kefir.

Um estudo realizado por Costa e Moura (2016) teve como proposta verificar se a acidez produzida pelo soro de leite fermentado com grãos de Kefir é suficiente para inibir cepas de *Salmonella spp., Escherichia coli e Klebsiella spp*. Os inóculos foram submetidos a processo de incubação em estufa bacteriológica pelo período de 24, 48 e 72 horas, os resultados alcançados demonstraram que a elevação do pH obtido pela fermentação de 24 horas não foi capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano, a

fermentação de 48 horas teve efeito antagônico frente *Salmonella spp*. e *Escherichia coli*. Entretanto, não apresentou qualquer ação de bloqueio sobre a *Klebsiella* spp. A fermentação de 72 horas inibiu totalmente o crescimento de todas as bactérias analisadas, confirmando que a acidez instituída pelos microrganismos presentes no kefir apresentou impacto no crescimento microbiano dos patógenos avaliados.

Lima (2018) observou a ação antimicrobiana de peptídeos com atividades biológicas resultante da fermentação de leite de ovelha por grãos de kefir contra patógenos. É relatado neste estudo que frações peptídicas menores que 3kDa, resultantes da fermentação pelos grãos, durante a digestão gastrointestinal *in vitro* na concentração de 5 mg/ mL, apresentou resultados de atividade antimicrobiana. Observou-se uma alta atividade da fração antes da digestão (SMK) contra *S. typhimurium* atingindo valores de inibição de 75,89%, após digestão gástrica (DG) de 90,06% e disgestão pancreática (PD) de 40,87.

3.1.2. Ação antagônica frente à *Escherichia coli*

Em um estudo realizado por Tussolini et al. (2009), foi verificado que 95% das cepas isoladas de kefir apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. O maior halo de inibição formado foi de 1,67 mm.

Estudos realizados por Weschenfelder et al. (2009) demonstraram que tanto o kefir como o soro do produto, na concentração testada (50%), apresentaram efeito antimicrobiano e inativação de um inóculo de 10^8 UFC/mL de *Escherichia coli*.

Dias et al. (2012a) também encontraram resultados positivos para presença de *Escherichia coli* após fermentação artesanal de até 72 horas de kefir, o que conferiu variação no microbioma dos grãos.

Lactobacillus sp. isolados de grãos de kefir apresentam atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* O157:H7, em que 59 dos 60 isolados apresentaram antagonismo frente ao patógeno com médias de halos com 1 mm ou mais (DIAS; SILVA; TIMM, 2018).

Chamon (2018) testou o efeito antagônico de 3 amostras de kefir frente *Escherichia coli*, e em seu estudo constatou-se que apenas uma das amostras apresentou efeito antimicrobiano com formação de halo, que demonstrou a formação de substâncias antagonisticas pela fermentação pelos grãos. Este estudo apontou que a diferença

microbiológica dos grãos pôde afetar sua capacidade de antagonizar patógenos, uma vez que duas das amostras avaliadas não apresentaram efeitos contra *E. coli.*

Weschenfelder et al. (2018) comprovaram que duas amostras de kefir apresentaram efeito antagonístico frente a *Escherichia coli* (ATCC 11229), após 24 horas de exposição ao fermentado, com redução da densidade populacional de 4,47 x 10^8 UFC.g^{-1} (tempo 0) para 2,13 x 10^6 UFC.g^{-1} (tempo 24).

3.1.3. Ação antagônica frente à *Staphylococcus aureus*

Ulusoy et al. (2007) verificaram que o kefir possuiu efeito antagônico *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, sendo os tempos 24 e 48 horas de fermentação os que apresentaram os melhores efeitos.

Tussolini et al. (2009), também relataram efeito antagônico de 20 cepas isoladas do grão de kefir e 90% destas foram efetivas com ação antimicrobiana, e apresentaram diferentes intensidades contra *S. aureus*. Uma das cepas recebeu destaque por formar um halo maior que 1,95 mm.

Dias, Silva e Timm (2018), determinaram por meio de seus estudos a atividade antimicrobiana dos isolados de kefir contra *Staphylococcus aureus*. Dos microrganismos isolados dos grãos, 56 apresentaram formação de halos de 1 mm ou mais, e a leitura de densidade ótica foi diferente dos controles após 6 e/ou 8 horas de incubação, no teste de sobrenadante, que aponta efeito antagônico das cepas isoladas.

Weschenfelder et al. (2018) em seus estudos demonstraram que as formulações de kefir utilizadas no trabalho apresentaram efeitos antimicrobianos significativo contra *S. aureus* (ATCC 25923).

3.1.4. Ação antagônica frente à *Listeria monocytogenes*

Santos (2008) em seu estudo encontrou uma faixa de inibição de *Listeria monocytogenes* de 44,99% à 73,05% de três amostras de kefir recolhidas em cidades diferentes.

Ao utilizarem cepas de *Enterococcus durans* isolados de grãos de kefir e de diferentes fermentados de kefir em testes de atividade antimicrobiana direto, Carasi et al. (2014) verificaram a ação das mesmas frente a vários patógenos como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. Os autores concluíram neste estudo que pelo menos duas cepas das treze que foram isoladas apresentaram efeito antimicrobiano frente a todos os patógenos, sendo que destes isolados cada um foi capaz de inibir pelo menos duas bactérias patogênicas diferentes e seis inibiram, de alguma forma, *L. monocytogenes*.

Auad (2014) isolou cepas de kefir e verificou os isolados quanto à capacidade inibitória frente às cepas de *Listeria monocytogenes*, utilizando-se teste de placas de micro titulação. Foi verificada a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por até 30 horas de incubação e o autor concluiu que as cepas isoladas de kefir são produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes*.

Morais (2015) avaliou o efeito de isolados de grãos de kefir para inibir *Listeria monocytogenes* em produto cárneo, e em seu experimento é afirmado que *Leuconostoc mesenteroides* isolado do grão, tem potencial promissor por apresentar efeito antagonístico frente a cepas do patógeno em questão, devido ser capaz de produzir substâncias similares a bacteriocinas.

3.1.5. Ação antagônica frente à *Bacillus cereus*

Amostras de kefir foram capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) que variaram em média de 48,08 % a 76,69 % entre os microrgranismos patogênicos (SANTOS, 2008).

Estudo avaliou a atividade antimicrobiana de grãos de kefir de origem italiana frente a cepas de *Bacilus cereus* e *Clostridium perfringes* inoculadas (10^6 UFC / g), mantidas a 4 ° C por 30 dias. Nas condições desse experimento, foram necessários um mínimo de 12 dias para a redução total da carga microbiana, sendo o *Clostridium perfringes* o mais sensível. O pH dos leites fermentados permaneceu entre 3,6 e 4,1, mostrando que as bactérias patogênicas podem sobreviver por um tempo significativo a um pH baixo e a temperaturas refrigeradas (ANSELMO et al., 2010).

Santos et al. (2013) testaram a capacidade antagônica do kefir a partir de três preparações artesanais de grãos e encontraram efeito antagônico frente a *Bacillus cereus*. Além disso, foi relatado no experimento que o pH não foi responsável pela

inibição, e é sugerido pelos autores que outras substâncias presentes no leite fermentado, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, possam estar associadas à capacidade antagônica.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O kefir é considerado um alimento potencialmente probiótico, que acarreta diversos benefícios ao consumidor e possui sabor atrativo. Além disso, apresenta efeito antagônico frente a diferentes microrganismos patogênicos devido às substâncias produzidas pelas bactérias láticas, devidos aos lactobacilos presentes nos grãos.

Novos estudos devem ser realizados a fim de comprovar quais substâncias possuem efeito de inibição frente aos patógenos e deterioradores avaliados. Além disso, é importante verificar quais isolados podem ser utilizados em outros alimentos atuando como antimicrobiano. Diante dos estudos relatados verifica-se que o kefir apresenta potencial de uso na elaboração de novos produtos, agregando ao mercado um alimento potencialmente saudável.

5. REFERÊNCIAS

ANSELMO, R. J.; VIORA, S. S.; OJEDA, P. A.; LAUSADA, L. I. Projeto antagônico do kefir sobre endosporas e células vegetativas de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* . **Información Tecnológica** , v. 21, p. 131-138, 2010.

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food,** v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias láticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of a functional soy product with addition of soy fiber and fermented with probiotic kefir culture. **Brazilian Archives of Biologyand Technology**, v.57, n.3, p.402-409, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, outubro de 2007.

CAETANO, D. R.; MONTANHINI, M. T. M. Análise microbiológica de leite fermentado kefir produzido com leite contaminado por *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 33-38, 2014.

CARASI, P.; JACQUOT C.; ROMANIN, D. E.; ELIE, A.-M.; ANTONI, G. L.; URDACI, M. C.; SERRADELL, M. A. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 193-200, 2014.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. de O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. 480p.

COSTA, S.D.S.; MOURA, L.B. Análise da acidificação produzida pelo kefir de leite tradicional entre cepas de *Eschericha coli*, *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp. **Revista saber científico**, p.1-16, Porto Velho, 2016.

CHAMON, G. G. **Caracterização microbiológica de grãos de kefir e avaliação da propriedade inibitória sobre diferentes cepas bacterianas.** 2018. 20f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Unaí, 2018.

DIAS, P.A.; SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; LEAL, M.C.G.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; TIMM, C.D. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 177- 181, 2012a.

DIAS, M.T.; BRICIO, S.M.L.; ALMEIDA, D.O.; OLIVEIRA, L.A.T.; FILIPPIS I.; MARIN, V.A. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.4, p.747-753, 2012b.

DIAS, P. A.; ROSA, J. V. da.; TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-05, 2016.

DIAS, P. A., SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-8, 2018.

DINIZ, R. O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.13, p.19-21, 2003.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P.S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. **Food microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.

HSIEH, H. H.; WANG, S. Y.; CHEN, T. L.; HUANG, Y. L.; CHEN, M. J.Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73-81, 2012.

JANUÁRIO, J.G.B.J. Kefir Beverage Development: Standardization of Process Parameters. **Brazilian jornal of food Reseach**, v. 7, n. 2, p. 80-95, 2016.

LIMA, M. dos S. F. de. **Caracterização microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir**. 2018. 145f. Tese (Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

LIKOTRAFITI, E.; VALAVANI, P.; ARGIRIOU, A.; RHOADES, J. In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefiri* isolated from kefir grains. **International Dairy Journal**, v.45, p.23-30, 2015.

MACHADO, B. A.; REIS, J. H.; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. Mapeamento tecnológico de patentes de kefir. **Cadernos de Prospecção,** v.5, n.2, p.86, 2014.

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal Microbiol. Biotechnol.**, v.26, n.2, p. 1241-1250, 2010.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. D. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693-702, 2011.

MARTINS, J. D. F. L.; MARINHO, E.; FIRMINO, H. H.; DA CRUZ RAFAEL, V.; FERREIRA, C. L. D. L. F. Avaliação da adição do Kefir em dieta hospitalar. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.386, p.13-19, 2012.

MENESTRINA, F.; GRISALES, J. O.; CASTELLS, C. B. Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography. **Microchemical Journal,** v.128, p.267-273, 2016.

MIGUEL, M. G. D. C. P.; CARDOSO, P. G.; DE ASSIS LAGO, L.; SCHWAN, R. F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v.43, n.5, p.1523-1528, 2010.

MORAIS, M. F. de. **Inibição de *Listeria monocytogenes* em salsicha por *Leuconostoc mesenteroides* isolada de grãos de kefir.** 2015. 95f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MURASHOVA, A. O.; NOVAKSHONOV, A. A.; UCHAIKIN, U. F. The effectiveness of using bifidokefir for the treatment of severe intestinal infections and the connection of dysbiosis in children. **Dairyof Science Abstracts**, v. 59, p. 42, 1997.

PIETTA, G. M; PALEZI, S. C. Desenvolvimento de um iogurte sabor mirtilo à base de kefir e com reduzido teor de lactose. **Unoesc & Ciência**, v. 6, n. 5, p. 163-172, 2015.

RAIMUNDO, I. de C. **Caracterização microbiológica e avaliação de propriedades imunomodulatória e inibitória do kefir sobre *Salmonela typhimurium.*** 2013. 95f. Tese (Pós-Graduação em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M.; GRZEŚKOWIAK, Ł. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; MARIA DO CARMO, G. P. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.

REIS, S. A. D. **EFEITO do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar**. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

ROMANIN, D.; SERRADELL, M.; MACIEL, D. G.; LAUSADA, N.; GARROTE, G. L.; RUMBO, M. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International journal of food microbiology**, v.140, n.2, p.102-108, 2010.

SANTOS, F.L.; SILVA, E.; SILVA, J.; BARBOSA, A.; SOUZA, A. C. Promoção do consumo de alimentos funcionais no recôncavo da Bahia: Estratégias de popularização do kefir. **Revista Extensão,** v.3, n.1, 2012.

SANTOS, J. P. V.; MENDONÇA, R.C.S.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M. M; PINTO, C.L.O.; FERREIRA, C.L.L.F. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 823-827, 2013.

SANTOS, M. R.; BASSO, C. Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de kfir. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v.14, n.1, p.93-100, 2016.

SANTOS, J. P. V. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. 2008. 78f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SOTTORIVA, H. M.; MELO, D. R.; MATIAS, T. C. F.; FURIOSO, A. A.; DOS SANTOS, L. P.; ALVES, G. Características e propriedades do Kefir. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 21, n. 4, p.141-142, 2018.

TAS, T.K.; EKINCI, F.Y.; GUZEL-SEYDIM, Z.B. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Jounal Dairy Technology**, v.65, n.1, p.126-131, 2012.

TUSSOLINI, L.; JUSTO, T. H.; SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D. Atividade antibiótica de cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium. In*: Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão, 1., 2009, Guarapuava, PR. **Anais** [...]. Guarapuava, 2009.

ULUSOY, B. H.; ÇOLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M. E. An *in vitro* study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi**, v. 37, p. 103-107, 2007.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-Escherichia coli em Kefir e soro de Kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Viçosa, MG**, v. 64, n. 368, p. 48-55, 2009.

WESCHENFELDER, S.; PAIM, M. P.; GERHARDT, C.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Kefir: composição e avaliação da atividade antagonista in loco frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Ciências Agronômicas**, v. 49, n. 3, p. 450-457, 2018.

YOVANOUDI, M.; DIMITRELI, G.; RAPHAELIDES, S. N.; ANTONIOU, K. D. Flow behavior studies of kefir type systems. **Journal of Food Engineering**, v.118, n.1, p.41-48, 2013.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO JR. M.; DE CICCO SANDES, S. H.; NICOLI, J. R.; NUNES, Á. C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.

CAPÍTULO 9 - POTENCIAL PROTEOLÍTICO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO DETERIORANTE NAS CASEÍNAS

Patrícia Rodrigues Condé
Scarlet Ohana Da Silva Gandra
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
Larissa Mattos Trevizano
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
Maurilio Lopes Martins

1. INTRODUÇÃO

O leite, alimento de alto valor nutricional, possui grande relevância na alimentação humana, sendo rico em lactose, proteína, gordura e em outros constituintes essenciais, como vitaminas e minerais. Sua composição pode variar em função de vários fatores, incluindo a raça e espécie do animal, fase de lactação, época do ano, fatores zootécnicos, dentre outros (RODRIGUES et al., 2013).

A melhoria das condições de produção, obtenção, estocagem, transporte e acondicionamento nas indústrias são etapas fundamentais para garantir a qualidade do leite e de seus derivados. A estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil na década de 1990, sendo regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa n.º 51 (BRASIL, 2002), retificada, posteriormente, pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011) e pelas Instruções Normativas n.º 76 (BRASIL, 2018a) e n.º 77 (BRASIL, 2018b).

A prática da refrigeração do leite cru na fonte de produção reduz as perdas econômicas e de rendimento, causadas pela atividade acidificante de bactérias mesófilas, mas permite a seleção de bactérias psicrotróficas, que são aquelas capazes de se multiplicarem a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento e são relacionadas a problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios (PINTO, 2004; BARBOSA et al., 2009; BRANDÃO et al., 2010; PINTO et al., 2016).

Muitas espécies de bactérias psicrotróficas que compõem a microbiota do leite cru multiplicam-se em temperaturas baixas, impostas pelo armazenamento, e produzem enzimas extracelulares termorresistentes, como proteases e lipases, que deterioram o leite sob refrigeração, bem como após o processamento devido à atividade enzimática residual (PINTO, 2004; TOPÇU; NUMANOGLU; SALDAMLI, 2006; MARCHAND et al.,

2008; MARTINS et al., 2015). A ocorrência dessas bactérias em leite cru é estudada em muitos países, considerando a dificuldade de controlar a sua multiplicação durante o armazenamento do leite sob refrigeração (JAY, 2005; MARTINS et al., 2005; PINTO; MARTINS; VANETT, 2006; MENEZES et al., 2014; CONDÉ et al., 2020).

Portanto, o desenvolvimento de métodos que possam contribuir para a prevenção de perdas de rendimento dos produtos lácteos e a destinação adequada do leite cru ao processamento mais apropriado é relevante (COSTA, 2014). Assim, conhecer a atividade proteolítica e comparar o potencial de hidrólise de bactérias psicrotróficas contaminantes, isoladas de leite cru refrigerado granelizado, nas caseínas do leite pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida é relevante.

2. GRANELIZAÇÃO DO LEITE CRU NO BRASIL

Os primeiros relatos sobre a organização da produção leiteira no Brasil ocorreram em 29 de março de 1952 com o Decreto 30.691, que aprovou o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), aplicado nos estabelecimentos que realizavam comércio interestadual ou internacional, tornando obrigatória a pasteurização, bem como a inspeção e o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) nos rótulos dos produtos lácteos (VILELA, 2017).

Esse decreto delimitou a busca pela melhoria da qualidade da produção de leite e permaneceu em vigor até o fim da década de 1990, quando a Portaria n.º 56 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamentava a qualidade do leite e dava outras orientações, criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite - PNQL. O programa foi alicerçado em três pilares. Dentre eles, os parâmetros regulatórios da qualidade do leite nacional, base da Instrução Normativa n.º 51, vigente de 2002 até 2011 (BRASIL, 2002) e substituída pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011), quando os leites tipos B e C passaram a ser identificados apenas como leite cru refrigerado. Assim, os padrões nacionais de qualidade eram alinhados aos internacionais. Posteriormente, essa legislação foi atualizada pela Instrução Normativa n.º 76, que traz o regulamento técnico do leite cru refrigerado (BRASIL, 2018a) e pela Instrução Normativa n.º 77, que regulamenta a inspeção sanitária da obtenção, acondicionamento e transporte do leite cru até a recepção em estabelecimento registrado no serviço de inspeção federal (BRASIL, 2018b).

A coleta de leite cru refrigerado a granel consiste em recolher o produto em veículos, com tanques isotérmicos construídos com aço inoxidável, diretamente do tanque de resfriamento por expansão direta. Uma característica importante da coleta a granel é a necessidade de que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento na usina de beneficiamento seja de no máximo 48 horas, demandando um planejamento para a coleta, que respeite essa restrição, de forma que o tempo total entre o armazenamento na propriedade e no veículo de transporte não ultrapasse dois dias (MALACARNE, 2017).

Conforme Miguel, Teodoro e Ahashiro (2007), o resfriamento adequado do leite cru na propriedade rural pode proporcionar benefícios importantes como: manutenção da qualidade da matéria-prima, redução da deterioração do leite por bactéria mesofílicas e aumento da eficiência produtiva do produtor e da indústria. Reche et al. (2015) demonstraram que o uso correto dos tanques resfriadores possibilita a manutenção da qualidade microbiológica do leite em relação à contagem bacteriana total. O tempo de resfriamento na propriedade também se apresentou como um fator coadjuvante na qualidade do leite cru, ressaltando a importância do tempo adequado de refrigeração estabelecido pela legislação vigente.

O resfriamento é um fator importante na contenção do crescimento bacteriano, porém se um controle efetivo da contaminação inicial não for realizado, mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação vigente para a conservação do leite, pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima associada à multiplicação da microbiota psicrotrófica (MALACARNE, 2017). Portanto, o uso apenas da refrigeração não garante a qualidade do produto. É fundamental que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para conter a contaminação inicial e manter as contagens bacterianas em níveis baixos (PINTO et al., 2014; CONDÉ, 2018).

3. BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS CONTAMINANTES COMUMENTE ISOLADAS DE LEITE CRU

Bactérias psicrotróficas ao multiplicarem-se no leite armazenado sob refrigeração ocasionam a sua deterioração com consequentes perdas de qualidade e de rendimento dos derivados lácteos (ARCURI et al., 2008; ÂNGELO et al., 2014; PINTO et al., 2014).

Embora a granelização tenha possibilitado a redução de perdas por acidificação do leite cru recebido pela indústria associada à minimização da multiplicação de bactérias mesofílicas acidificantes, deve-se considerar a possibilidade de multiplicação da microbiota psicrotrófica produtora de enzimas extracelulares deterioradoras e termorresistentes mesmo a temperaturas baixas, como 2 ºC (ÂNGELO et al., 2014; PINTO et al., 2014; CONDÉ et al., 2020).

Dentre as bactérias psicrotróficas contaminantes, comumente isoladas de leite cru de baixa qualidade microbiológica, incluem-se bastonetes, cocos e vibriões, esporuladas ou não, Gram-negativos ou positivos, aeróbios ou anaeróbios (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). A microbiota psicrotrófica Gram-negativa é predominante, e composta principalmente, por espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*. A microbiota Gram-positiva é composta, principalmente, por espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; PEREIRA, 2016; CONDÉ, 2018).

Bactérias psicrotróficas isoladas do leite, como *Pseudomonas*, são encontradas com maior frequência por apresentarem baixo tempo de geração nas temperaturas de refrigeração adotadas na cadeia produtiva do leite (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; ARCURI et al., 2008; MOREIRA, 2010). Essas bactérias possuem mecanismos de adaptação ao frio, sendo esta dependente das modificações que ocorrem nos lipídeos e nas proteínas. Segundo Russel (1990), as alterações nos lipídeos são importantes no mecanismo de regulação da fluidez e permeabilidade da membrana celular. De acordo com o autor, alterações nas proteínas são de natureza genotípica e são relacionadas às propriedades das enzimas e ao sistema de tradução.

Em diversos estudos encontram-se relatos da predominância de *Pseudomonas fluorescens* em leite cru de baixa qualidade em relação às demais espécies do gênero, que está especialmente, associada à intensa proteólise e lipólise do leite, tornando-se, muitas vezes, a microbiota dominante durante o armazenamento do leite cru refrigerado (MU; DU; BAI, 2009).

Adams, Barach e Speck (1976) constataram que, entre 70% a 90% dentre as bactérias psicrotróficas isoladas do leite por uma semana, eram *Pseudomonas*. Eneroth et

al. (1998) observaram maior frequência de isolamento de espécies de *Pseudomonas* (72% a 77%) em amostras de leite cru, de leite pasteurizado e de amostras ambientais de indústrias de laticínios. A predominância desse gênero pode ser explicada pelo fato de *Pseudomonas* sp. apresentar um tempo de geração curto, entre 0 ºC e 7 ºC (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Outro fator comprovado por pesquisadores é a capacidade de formação de biofilmes por espécies de *Pseudomonas*, associada à síntese de exopolissacarídeos. A presença de fímbrias e de flagelos nessas espécies também propicia a adesão e a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável o que dificulta o processo de higienização e propicia a resistência a agentes sanificantes (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Como já citado, as bactérias psicrotróficas contaminantes do leite, em sua maioria, produzem enzimas proteolíticas, lipolíticas e lecitinases termorresistentes que estão associadas à ocorrência de problemas tecnológicos (PINTO; MARTINS; VANETT, 2006; CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009; BRANDÃO et al., 2010; PEREIRA, 2016; PINTO et al., 2019).

As proteínas do leite incluem duas frações principais: caseínas, que são uma mistura das fosfoproteínas α, β, e k que se apresentam, principalmente, no estado de partículas coloidais (micelas) e proteínas do soro, que estão em solução. As proteases possuem atividade hidrolítica em várias frações da caseína, sendo essa proteína facilmente hidrolisada, devido à sua estrutura não helicoidal. Ressalta-se que a atividade proteolítica no leite associada à ação de espécies bacterianas não é correlacionada com a contagem de bactérias psicrotróficas e sim com o potencial proteolítico da espécie bacteriana (PINTO; MARTINS; VANETT, 2006; CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009; COSTA, 2014; BATISTA, 2015).

4. POTENCIAL DETERIORANTE DA MICROBIOTA PSICROTRÓFICA CONTAMINANTE EM LEITE CRU E PROBLEMAS TECNOLÓGICOS PARA A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Os microrganismos deterioradores apresentam grande potencial de causar problemas tecnológicos no processamento de leite e seus derivados como: instabilidade do leite ao calor, geleificação do leite UHT, alterações nas características sensoriais dos

derivados lácteos, viscosidade alterada em leites fermentados, perda de rendimento na produção de queijos, dentre outros (BARBOSA et al., 2009; PINTO et al., 2013).

As enzimas proteolíticas existentes no leite e seus derivados podem ser de origem endógena ou microbiana. As proteases produzidas por microrganismos, principalmente, por psicrotróficos, causam a proteólise das caseínas com consequente modificação das características físico-químicas do leite durante a sua vida de prateleira**.** As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ-caseína, resultando na desestabilização das micelas e na coagulação do leite, de forma análoga a da quimosina (RECIO et al., 2000; BATISTA, 2015).

Há uma grande variabilidade na atividade proteolítica entre os microrganismos, em especial, os psicrotróficos. Algumas estirpes apresentaram alta atividade proteolítica e outras apresentaram atividade muito baixa, tornando-se claro que diferentes estirpes de uma mesma espécie podem apresentar comportamentos variados, sendo que algumas apresentam maior atividade proteolítica em uma determinada temperatura, enquanto que outras parecem não sofrer influência dessa variação de temperatura na produção de enzimas proteolíticas (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009),

Nörnberg et al. (2010) isolaram alguns microrganismos psicrotróficos fortemente proteolíticos. As culturas foram inoculadas e incubadas em meio de cultura enriquecido com leite. A medida dos halos de clarificação foi avaliada a partir da evolução da proteólise no meio. Posteriormente, foi avaliada sua atividade proteolítica pelo método da azocaseína como substrato e o resultado expresso como Unidade Enzimática Proteolítica (UEP). Os autores constataram que a maioria das amostras inoculadas com diferentes estirpes apresentou atividade proteolítica inferior a 10 UEP/h, porém algumas apresentaram valores superiores a 20 UEP/h, sendo estas pertencentes às espécies de *Burkholderia cepacia* 1A4, *Klebsiella oxytoca* 8B3, *B. cepacia* 2A7, *Aeromonas* sp. 10B7 e *K. oxytoca* 1A5.

Segundo Zhang et al. (2015), a indústria de laticínios pode se beneficiar ao controlar a contaminação do leite com *P. fluorescens*. Esse monitoramento permite inferir a existência de proteases ativas nos produtos lácteos e maximizar a eficiência do processamento. O desenvolvimento de métodos envolvendo a avaliação da atividade proteolítica, indicativa do potencial de hidrólise das proteases no leite, tem grande importância na obtenção de produtos de boa qualidade.

Muitas bactérias psicrotróficas também produzem lipases extracelulares, sendo estas, responsáveis pela deterioração do leite e produtos lácteos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; TEBALDI et al., 2008). As lipases são resistentes à pasteurização, assim como a esterilização comercial (COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). A produção dessas enzimas está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do microrganismo, composição do meio e disponibilidade de oxigênio em que ele se encontra. Sua atividade é dependente do pH do meio, concentração de substrato e temperatura (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). Em geral, sua síntese é maior em temperaturas inferiores à temperatura ótima de crescimento do microrganismo (PEREIRA, 2016).

As lipases hidrolisam os triglicerídeos presentes no leite, causando a formação de ácidos graxos livres, mono e diglicerídios, resultando em altas concentrações de ácido butírico e capróico livres, compostos estes que conferem ao produto sabor de ranço (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007).

Pinto, Martins e Vanett (2006) e Arcuri et al. (2008) isolaram, quantificaram e caracterizaram bactérias psicrotróficas contaminantes isoladas de leite cru refrigerado. Foram observadas contagens microbianas que variaram nas amostras entre 10^2 e 10^7 UFC/mL, com predominância de bactérias psicrotróficas Gram-negativas e dentre estas, *P. fluorescens* foi a espécie predominante com alto potencial de degradação de proteínas e lipídeos do leite à temperaturas de armazenamento a 4 °C, 7 °C, 10 °C e 21 °C, sendo observado alto percentual de estirpes com capacidade de deterioração da caseína. Os autores demonstraram a alta capacidade deteriorante da maioria dos isolados bacterianos considerando que apresentaram atividade lipolítica e/ou proteolítica em temperaturas de refrigeração, o que indica o potencial de deterioração do leite e de produtos lácteos derivados.

Espécies de *Pseudomonas* produzem proteases com clivagens de peptídeos inespecíficas. Recio et al. (2000) analisaram a fração peptídica produzida a partir da degradação de proteínas do leite, mais especificamente da κ-caseína, associada à ação da quimosina ou a ação de proteases produzidas por *P. fluorencens* B52. A identificação e fracionamento das moléculas foram determinados por metodologia aplicada com cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), acoplada à espectrometria de massa. Os autores constataram frações peptídicas idênticas às encontradas no leite UHT armazenado por longo período e deduziram que as proteases

produzidas por microrganismos psicrotróficos também clivam a caseína na ligação 105-106, embora apresentam menor especificidade quando comparado com a quimosina, o que sugere que a presença de caseinomacropeptídeo (CMP) não é um indicador exclusivo de fraude em leite com soro de queijo.

Por outro lado, uma importante lipase produzida por bactérias psicrotróficas é a lecitinase, uma enzima que rompe a membrana do glóbulo de gordura do leite e expõe à hidrólise os triglicerídeos, resultando no ranço hidrolítico do leite (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; SANTOS; BERGMANN, 2003).

Kumaresan, Annalvilli e Sivakumar (2007) avaliaram a deterioração do leite cru por bactérias psicrotróficas em temperaturas de armazenamento de 2 °C, 4 °C e 7 °C, além das atividades lipolítica e proteolítica desses microrganismos ao longo de 14 dias, com o objetivo de detectar a temperatura adequada para seu armazenamento. A 2 °C, houve menor crescimento bacteriano e, consequentemente, menor atividade lipolítica e proteolítica de psicrotróficos. Além disso, observou-se melhor qualidade sensorial do leite comparado às outras temperaturas, visto que, 50% dos provadores foram capazes de identificar o sabor de ranço causado pela lipólise quando as concentrações de ácidos graxos livres estavam entre 0,18 e 0,20 mEq/kg. Quando as concentrações de ácidos graxos estavam na faixa de 0,25 mEq/kg, todos os entrevistados detectaram a rancidez. No estudo, o limiar sensorial de 0,25 mEq/kg não foi atingido até 14 dias, quando o leite foi armazenado à temperatura de 2 °C. Assim, os autores concluíram que o leite cru conservado a 2 °C, antes do processamento, mantém suas qualidades nutricional e sensorial, dando origem a produtos com maior valor agregado.

5. DETECÇÃO DE PROTEÓLISE DO LEITE

As proteínas do leite representam, aproximadamente, 3% dos sólidos do leite bovino. A caseína é a principal proteína desse alimento e constitui cerca de 80% das proteínas lácteas totais. Embora seja extremamente termorresistente, é uma fosfoproteína sensível à acidez, com ponto isoelétrico no valor de pH igual 4,6, precipitando-se em grandes micelas. A caseína é uma molécula complexa e, exclusivamente láctea (ARAÚJO, 2016).

A micela de caseína, por possuir uma característica anfótera, pode combinar-se com bases e com ácidos resultando na formação de caseinatos e de sais. Quase toda a

caseína apresenta-se na forma de micelas e, inclui quatro tipos de cadeias polipeptídicas: αs_1, αs_2, β e κ (ROMAN; SGARBIERI, 2005; ARAÚJO, 2016). Além disso, alguns derivados da caseína são formados por proteólise.

Do ponto de vista econômico, as caseínas são muito relevantes pelo seu alto valor nutricional e pelas suas características físico-químicas que influenciam, diretamente, na fabricação de diversos derivados lácteos (REIS et al., 2012).

Uma das alternativas para a detecção do potencial deteriorador das proteases é a determinação da atividade enzimática de proteases presentes no leite sobre substratos específicos que, quando hidrolisados, liberam produtos coloridos, os quais podem ser quantificados por densidade ótica (MACHADO, 2006). A azocaseína é um derivado da caseína que quando hidrolisada por ação de peptidases libera componentes coloridos solúveis na presença de ácido tricloroacético (GONÇALVES, 2013). Assim, essa molécula tem sido usada para determinação de atividade proteolítica ocasionada por bactérias deterioradoras do leite (PINTO, 2004).

A hidrólise da caseína e de outras proteínas também pode ser verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (MACHADO, 2006; PINTO et al., 2014; CONDÉ, 2018; CONDÉ et al., 2020). A eletroforese é uma técnica que permite a separação de diferentes proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida. Para Sgarbieri (1996), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese não desnaturante) ou com a proteína desnaturada pela ação de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE.

Assim, a composição proteica do leite pode ser determinada por diferentes técnicas, dentre elas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato (SDS-PAGE), a qual é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples e de grande poder informativo. Essa técnica consiste na migração de moléculas ionizadas na mesma direção, possibilitando, assim, a separação em várias frações (BRAMMER, 2001).

A eletroforese em gel de poliacrilamida atua por dois princípios: exclusão molecular, em função da porosidade característica do gel e migração no campo elétrico devido à diferença na densidade de cargas de cada proteína. Em meio alcalino, grande parte das proteínas apresentam cargas negativas e, quando aplicado um campo elétrico, ocorre a migração das mesmas para o polo positivo em diferentes velocidades, dependendo

também de suas propriedades físicas, densidade de cargas e tamanho molecular, de modo que se torna possível a separação da amostra em diferentes frações proteicas (SGARBIERI, 1996).

Segundo Silva-Junior (2001), o estudo sobre a eletroforese em gel é uma das principais ferramentas para a separação e caracterização de macromoléculas, com base no fato de que as moléculas como as proteínas possuem carga e, portanto, são capazes de mover-se quando submetidas a um campo elétrico. O autor complementa ainda, que a velocidade de deslocamento da molécula torna-se proporcional ao campo elétrico e a carga líquida da molécula, e torna-se inversamente proporcional ao seu raio, à distância entre os dois eletrodos e à viscosidade do meio.

A determinação das frações proteicas por eletroforese pode ser realizada com leite integral ou desnatado (KAMMOUN; BEJAR; ELLOUZ, 2006). A técnica pode ser usada para purificar as proteínas, ou seja, extraí-las a partir de uma mistura complexa, sendo fundamental conhecer a quantidade da proteína pesquisada em relação às outras proteínas e dispor de um método que permita dosar todas as proteínas do meio.

Estudos relacionam essa metodologia à análise das caseínas em amostras de leite ou de caseína precipitada em pH 4,6. Pinto et al. (2014) avaliaram a taxa de crescimento e a atividade proteolítica de estirpes de *P. fluorescens* isoladas a partir de leite cru, após incubação a 2, 4, 7 e 10 ºC. Os autores constataram, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o alto potencial das estirpes em degradar a caseína durante o armazenamento do leite a baixas temperaturas, recomendadas na legislação para conservação do leite cru. A hidrólise da caseína resultou na perda da estabilidade térmica do leite e na formação de fragmentos de baixa e média massa molar. Mesmo a baixas temperaturas, como 2 ºC houve hidrólise proteica e, em consequência, perda da qualidade do leite cru. Os autores ressaltaram a importância da implementação de medidas preventivas de contaminação na cadeia do leite.

Condé et al. (2020) constataram que isolados bacterianos proteolíticos apresentaram perfis diferentes de hidrólise das caseínas do leite, resultado indicativo da diferença de potencial de deterioração da caseína.

As amostras inoculadas com *P. fluorencens*, por 2 e 4 dias (Figura 1A e B, canaleta 6) apresentaram evidente hidrólise das frações proteicas (GANDRA, 2018). Após 4 dias de incubação a 7 ºC, constatou-se hidrólise mais intensa das frações de caseína por *P.*

fluorencens, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola* e *B. cepacia* (Figura 2B, canaletas 6, 8, 9 e 12, respectivamente). *Acinetobacter junii* e *Aeromonas hidrophyla/caviae* causaram uma menor hidrólise das frações de caseínas (Figura 1B, canaletas 10 e 11, respectivamente).

Por meio dos géis (Figura 1) pôde-se demostrar um alto arraste de proteínas, o que ocorre em função da hidrólise das caseínas do leite com liberação de peptídeos de menor massa molecular. Pinto et al. (2014) também observaram o alto potencial de bactérias psicrotróficas, como *P. fluorescens,* em hidrolisar, as caseínas, em especial a κ-caseína à 4, 7 e 10 ºC.

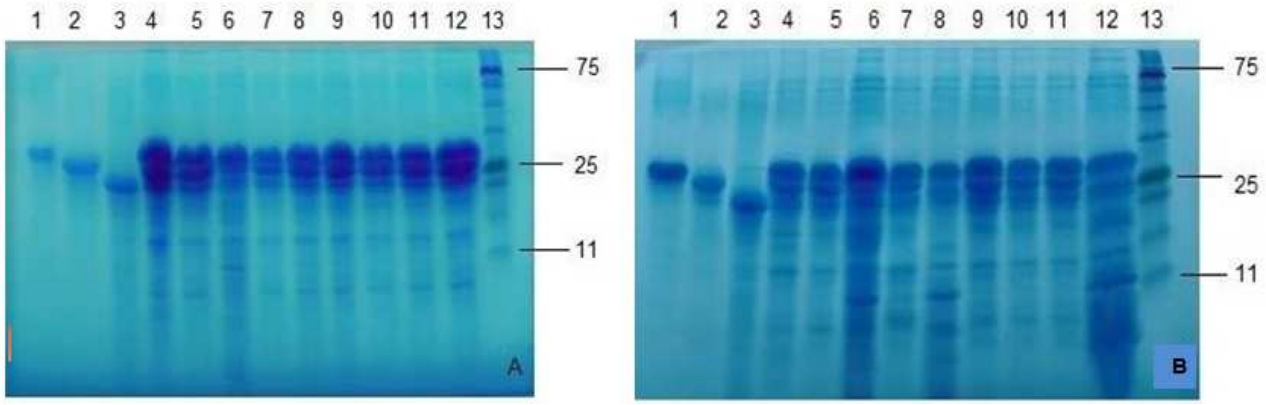


Figura 1. SDS-PAGE (15%) das caseínas provenientes de amostras do leite controle e de amostras de leite inoculadas, intencionalmente, e incubadas 7,0 ºC, por 2 dias (A) e por 4 dias (B) e coradas com *Coomassie R brilhant blue*. Canaletas: **1-** Padrão de α-caseína, **2-** Padrão de β-caseína, **3-** Padrão de κ-caseína, **4-** Controle tempo zero, **5-** Controle tempo 2 dias (A), Controle tempo 4 dias (B), **6**- *P. fluorencens*, **7-** *A. baumannii*, **8-** *S. maltophilia*, **9-** *P. luteola,* **10-** *A. junii/johnsonii*, **11-** *A. hidrophyla/caviae* **12-** *B. cepacia*, **13-** Marcador de Peso Molecular (kDa).
Fonte: Gandra (2018).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O potencial de degradação das proteínas de leite por bactérias psicrotróficas é variável com o gênero e a espécie, sendo que o grau de hidrólise ou deterioração aumenta com o tempo de armazenamento. *P. fluorescens* destaca-se em relação ao seu potencial proteolítico associado à características intrínsecas da espécie.

Portanto, o controle da microbiota contaminante do leite cru durante as diferentes etapas de obtenção do leite a fim de minimizar contaminações microbianas em especial o acesso de bactérias psicrotróficas Gram-negativas, incluindo espécies de *Pseudomonas*

ao leite, se faz muito importante. Outros fatores a serem considerados incluem o tempo e temperatura de armazenamento em tanques de expansão. Essas medidas são imprescindíveis para minimizar a deterioração de componentes do leite como proteínas, lipídeos e lactose pelo acúmulo de enzimas deterioradoras termorresistentes, a exemplo das proteases produzidas microbiota psicrotrófica, que atuam de forma inespecífica sobre as caseínas do leite e acarretam uma série de problemas tecnológicos e consequentemente, econômicos na indústria de laticínios.

O perfil de hidrólise das caseínas é variável com a espécie bacteriana e com o seu potencial proteolítico. A demonstração do perfil de hidrólise proteica, pelo método de eletroforese, permite visualizar e demonstrar o efeito deletério de bactérias psicrotróficas nas caseínas, o que implica na perda de estabilidade térmica, de qualidade e de rendimento de produtos lácteos. Dessa forma, a prevenção de contaminações microbianas no leite é um fator imprescindível para garantir condições adequadas de processamento, aumento da vida útil dos produtos lácteos e obtenção de produtos de acordo com os padrões de identidade e qualidade.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigt temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 823-827, 1976.

ÂNGELO, F. F.; RIBEIRO, C. S.; OLIVEIRA, L.; ARAÙJO, T. F.; CARDARELLI, H. R. Bactérias Psicrotróficas em leite cru refrigerado. **Revista Científica de Medicina Veterinária** - Periódico Semestral**,** v. 12, n. 22, p.1-14, 2014.

ARAÚJO, J. P. A. **Estabilidade alcoólica do leite: relação com frações proteicas e outros componentes**. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Universidade Norte do Paraná, Unidade Piza, Londrina, 2016.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2250-2255, 2008.

BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; BATISTA, C. S.; MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O. Avaliação de rendimento da produção dos queijos Minas Frescal, Minas Padrão e Mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens***. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 371, p. 27-34, 2009.

BATISTA, C. S. **Estudo de correlação entre a qualidade do leite cru refrigerado e do leite UHT integral**. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2015.

BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. p. 13.

BRANDÃO, V. I.; RODRIGUES, M. Z.; LEITE JUNIOR, B.R.C.; MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O**.** Influência da atividade proteolítica de bactéria psicrotrófica na qualidade de iogurtes tipo líquido, batido e sundae. *In*: Simpósio de Ciência, Inovação & Tecnologia, 3., 2010, Rio Pomba. **Anais** [...]. Rio Pomba, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 76, de 26 de Novembro de 2018. Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, na forma desta Instrução Normativa e do Anexo Único, alterada pela Instrução Normativa n.º 76, de 03 de Maio de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de Novembro de 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 77, de 26 de Novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de Novembro de 2018b.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 65-73, 2009.

CONDÉ, P. R. **Potencial deteriorador e diversidade da microbiota do leite cru granelizado**. 2018. 121 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2018.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L. O.; GANDRA, S. O.; TREVIZANO, L. M.; CAMPOS, A. N. R.; da SILVA, R. R.; MARTINS, M. L. Proteolytic Action of Psychrothrophic Bacteria in Bovine Milk Caseins. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 40220-40236, 2020.

COSTA, J. F. **Atributos de qualidade associados à ocorrência de proteólise em leite cru granelizado**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microrganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 172-207, 1982.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 829-834, 1998.

GANDRA, E. O. S. G. **Atividade Proteolítica de Bactérias Psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado e seu efeito sobre as caseínas**. 2018. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação do Sudeste de Mimas Gerais, Campus Rio Pomba, Rio Pomba, Minas Gerais, 2018.

GONÇALVES, A. N. **Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus.*** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 73, p. 7162-7168, 2007.

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

KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrases. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 249-254, 2006.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.

MACHADO, A. D. S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por antissoro policlonal**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MALACARNE, R. **Diretrizes de qualidade para a produção de leite em propriedades rurais no oeste do estado do Paraná.** 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; HEYNDRICKX, M.; DEWETTINCK, K.; DE BLOCK, J. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514-519, 2008.

MARTINS, M. L.; PINTO, U. M.; RIEDEL, K.; VANETTI, M. C. D. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 207-217, 2015.

MARTINS, M. L., ARAÚJO, E. F., MANTOVANI, H. C., MORAES, C. A., VANETTI, M. C. D. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology,** v. 102, p. 203-211, 2005.

MENEZES, M. F. C; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambienta**l, v. 18, p. 76- 89, 2014.

MIGUEL, E. M.; TEODORO, V. A. M.; AHASHIRO, E. K. N. Microrganismos Psicrotróficos em Leite. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, n. 355, p. 38-42, 2007.

MOREIRA, G. I. P. **Caracterização de bactérias Gram positivas psicrotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos.** 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 725-734, 2009.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta scientiae veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46. 2010.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos. Efectos sobre la lehe y los productos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, n. 130, p. 251-260, 1983.

PEREIRA, F. A. B. **Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado**. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR, Londrina, 2016.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru resfriado granelizado usado para produção de leite UHT**. 2004. 97f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agricola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D.; SILVA, R. F. P. Bactérias psicrotróficas e importância do controle de sua contaminação na cadeia do leite. *In*: PINTO, C. L. O.; PICCOLO, M. P.; BRITO, M. A. V. P.; MARTINS, M. L.; MACÊDO, C. S.; FARIÑA, L. O. **Qualidade microbiológica do leite cru.** Viçosa: EPAMIG/Zona da Mata, p. 135-156, 2013.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C. L. O; MACHADO, G. S.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. M.; VANETTI, M. C.D.; Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk**.** **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 16-25, 2014.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, S. G.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Sedimentação, atividade proteolítica e proteólise de leite UHT integral durante o armazenamento. **Revista do Instituto de Latícinios Cândido Tostes**, v. 71, p. 197-205, 2016.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; CAMPOS, N. L. F; BENEVENUTO, W. C. A. N; MARTINS, E. M. F.; AZEVEDO, H. L.; CRUZ, A. G. Microbiologia do leite cru. *In*: CRUZ, A. D. C; ZACARCHENCO, P. B.; AUGUSTO, F. C. O; CORASSIM, C. H. (ed.). **Microbiologia, Higiene e Controle de Qualidade no Processamento de Leites e Derivados**. 1.ed. Rio de janeiro: Elsevier, v. 1, p. 5-42, 2019.

RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; D`OVIDEO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 828-834, 2015.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

REIS, A. M.; COSTA, M. R.; COSTA, R. G.; SUGUIMOTO, H. H.; SOUZA, C. H. B.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Efeito do grupo racial e do número de lactações sobre a produtividade e a composição do leite bovino. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 3421-3436, 2012.

RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A. A.; DIAS, M. T.; ARONOVICH, M. **Qualidade do Leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices**. Niterói, RJ: Programa Rio Rural, n.37, 2013. 53p.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimento**s, v. 25, p. 468- 474, 2005.

RUSSEL, N. J. Cold adaptation of microrganisms. Philosophical Transaction of the Royal Society of London. **Series B: Biological Science**, v. 326, p. 608-611, 1990.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte, sobre a qualidade microbiológica do leite cru. III – Psicrotróficos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 86-91, 2003.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo, SP: Livraria Varela, 1996. 180 p.

SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**: Guia teórico - prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.125 p.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in Milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-41, 1997.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.

TOPÇU, A.; NUMANOGLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT Milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 633-638, 2006.

VILELA, D.; REZENDE, J.C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Politica Agrícola**. Ano XXVI, n. 1, p. 1-20, 2017.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006. p. 782.

ZHANG, S.; LI, H.; ULUKO, H.; LIU, L.; XIAOYANG, P.; LV, J. Investigation of protease production by *Pseudomonas fluorescens* bj-10 and degradation on milk proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2466-2472, 2015.

CAPÍTULO 10 - IMPORTÂNCIA DO FERMENTO ENDÓGENO E DAS CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO PARA O QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO

Rosana Campos do Vale
Sâmya Petrina Pessoa Oliveira
Cristina Henriques Nogueira
Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto
Maurilio Lopes Martins
José Manoel Martins

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) do Serro é um produto de extrema importância não só para o estado de Minas Gerais, mas também para o Brasil, tanto pela geração de renda e ocupação, quanto por sua conotação sociocultural, sendo produzido quase que exclusivamente pela agricultura familiar (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007). Esses queijos são considerados patrimônio imaterial do estado de Minas Gerais e possuem certificado de indicação geográfica (FIGUEIREDO, 2014), o que dão a eles uma boa notoriedade a nível nacional.

No processo de produção do QMA do Serro são utilizados leite cru e fermento lático natural, popularmente designado por “pingo”. Nos últimos anos, alguns produtores de queijo artesanal da região, tem utilizado como fermento lático o próprio queijo artesanal, com 3 a 5 dias de fabricação, que é ralado e adicionado ao leite, sendo denominado pelos produtores como “rala” (FIGUEIREDO, 2014).

Não existe ainda uma regulamentação para a utilização da “rala” na produção de queijos artesanais. Faltam estudos científicos que indiquem quais os efeitos desse tipo de fermento nas características físico-químicas e microbiológicas dos queijos artesanais, uma vez que alguns produtores e consumidores afirmam, empiricamente, que há diferença entre os tipos de fermento (“pingo” e “rala”).

Além do tipo de fermento, outro fator que pode afetar as características dos queijos é a condição de maturação a que são submetidos. Esta, por sua vez, é influenciada por dois elementos fundamentais: temperatura e umidade relativa do ar (URA), que podem interferir tanto no crescimento microbiano, quanto na composição do queijo (LOURENÇO NETO, 2013).

Em Minas Gerais, foram criados dois Centros de Qualidade do QMA, nas cidades de Medeiros (região da Serra da Canastra) e Rio Paranaíba (região do Cerrado), visando maior padronização do processo de maturação e fortalecimento das Associações de Produtores para a venda coletiva dos queijos (EMATER/MG, 2013).

Estes centros permitem, por meio de um acordo entre o Ministério da Agricultura e o serviço de inspeção sanitária de Minas Gerais, que os queijos sejam comercializados para as demais unidades da Federação, num processo equivalente ao Sistema Brasileiro de Inspeção (SISBI). A Portaria nº 1.305, de 30 de abril de 2013, permite que o produto saia dos Centros de Qualidade diretamente para a mesa do consumidor brasileiro (MINAS GERAIS, 2013).

O QMA, embora em sua maior parte seja consumido fresco, tradicionalmente foi reconhecido pela segurança e sabor diferenciado promovido pelo tempo de maturação (MARTINS et al., 2015). Para os queijos do Serro, este tempo estabelecido pela Portaria nº 1.305 (MINAS GERAIS, 2013) é de 17 dias, para queijarias integrantes do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA), baseado em Martins (2006), que estudou queijos artesanais desta região num período em que nenhuma queijaria ainda havia se cadastrado junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Atualmente, mais de 100 produtores do Serro já possuem o cadastro do IMA para a produção de QMA, o que pode, em razão das exigências da inspeção, contribuir para a redução do seu tempo de maturação.

Ainda não se sabe qual a influência da maturação dos QMA em condições controladas (temperatura e URA) e nem o tempo de maturação que podem levar para que os mesmos sejam colocados no mercado atendendo à legislação (MINAS GERAIS, 2013), além da influência dos tipos de fermentos na qualidade dos produtos.

Desta forma, verifica-se a necessidade de estudos científicos que permitam avaliar os efeitos da maturação nas características e na qualidade de queijos artesanais, em condições de temperatura e URA controladas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijo Minas artesanal (QMA)

No Brasil existe uma produção significativa de queijos artesanais fabricados a partir de leite cru, cujos processos produtivos tradicionalmente têm sido passados de geração

em geração. Representam uma forma de subsistência de inúmeras famílias no meio rural, além da bagagem cultural das regiões produtoras (COSTA JÚNIOR et al., 2014).

O QMA sobreviveu às pressões da modernização dos processos de produção, não só pelo apego às tradições, mas também pelo isolamento das propriedades produtoras, espalhadas pelo Estado, o que contribuiu para a preservação de produtos com características próprias e de grande valor cultural e econômico (EMATER/MG, 2013).

A prática queijeira artesanal em Minas Gerais retrata valores e sentimentos vividos, tornando-se uma das mais significativas e importantes manifestações, do ponto de vista econômico e cultural, fortemente enraizadas no universo do dia a dia dos agricultores que caracterizam os territórios queijeiros (MENEZES, 2011a).

Estudos históricos, agrogeológicos e de condições de solo e clima foram realizados para identificar e definir as regiões tradicionalmente produtoras do QMA, feitos a partir de leite cru (BRASIL, 2011). Atualmente, existem sete microrregiões reconhecidas e oficializadas como produtoras do QMA: Serro, Serra da Canastra, Cerrado (antigo Alto Paranaíba), Araxá, Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre. As regiões de Alagoa (queijo tipo Parmesão), Vale do Jequitinhonha (queijo Cabacinha) e Vale do Suaçuí (queijo tipo Parmesão) também são importantes na produção de queijos artesanais em Minas (Figura 1). As sete primeiras regiões, produtoras do QMA, possuem juntas mais de 9 mil produtores, com uma produção estimada de 50 mil toneladas de queijo por ano (EMATER/MG, 2017).

A produção artesanal, apesar da precariedade que muitas vezes apresenta, propicia vantagens competitivas e é capaz de originar processos dinâmicos, como a capacidade de gerar postos de trabalho e proporcionar renda aos agricultores e, por consequência, reduzir em determinados territórios, as taxas de emigração rural. A discussão que envolve a produção de queijos artesanais no Brasil está intrinsecamente relacionada à preservação de um alimento como identidade, a sua contribuição na reprodução social do agricultor familiar e a contradição a respeito da informalidade e dos entraves, ou seja, a problemática higiênico-sanitária no processo de produção e da legalização (MENEZES, 2011a).

Embora, desde 2008, o modo de fazer seja protegido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio imaterial, o QMA ainda não possui uma legislação adequada às suas características, estando subordinado a exigências e

padrões da indústria. Assim, as dificuldades crescentes à produção e comercialização fazem com que estes pequenos produtores continuem na ilegalidade, com a comercialização destes queijos tradicionalmente brasileiros no mercado informal (DORES; FERREIRA, 2012).

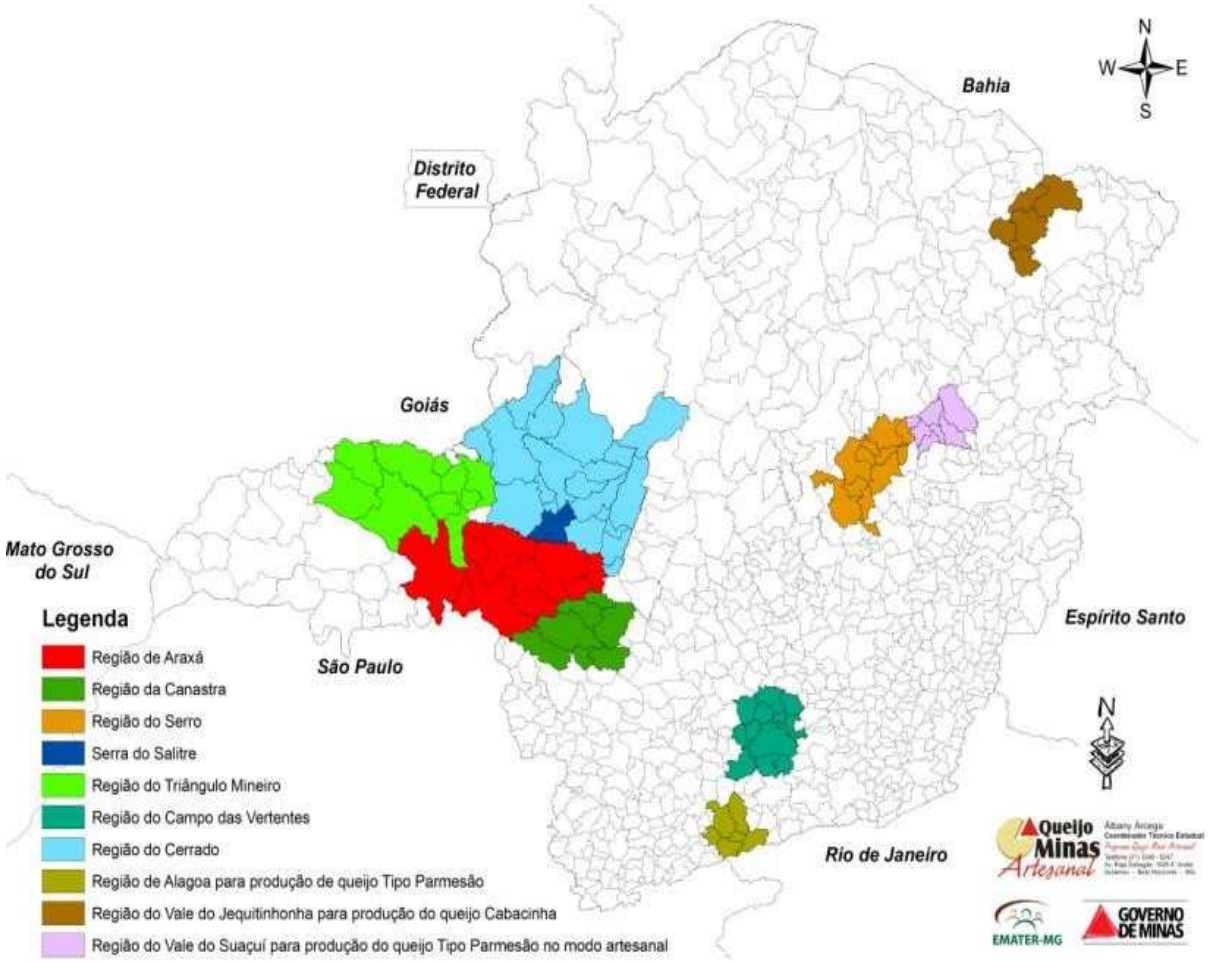


Figura 1 – Mapa das regiões produtoras de queijos artesanais do estado de Minas Gerais.
Fonte: EMATER/MG (2015).

A comercialização do QMA, realizada informalmente, não inspecionada, dificultava o seu controle de qualidade. A tradição secular do queijo produzido com leite cru se confrontava com a exigência da pasteurização. Os produtores argumentavam que a inexistência dos chamados fermentos naturais modificava o sabor do produto. Com isso, as associações se uniram a favor da qualidade do produto e numa luta contra a legislação restritiva (MENEZES, 2011a).

Dessa forma, todo o processo de luta pela defesa da tradição e conquista do reconhecimento, pautaram-se nas relações entre os produtores do QMA, políticos e consumidores que se uniram na luta pelo seguimento da prática artesanal e o reconhecimento desse queijo como um Patrimônio Cultural. Os representantes dos queijeiros e o governo mineiro chegaram a um acordo, adotando padrões sanitários tanto para a criação do rebanho, quanto para a higiene da produção do queijo artesanal e aprovaram uma Lei Estadual nº 14.185 em 31/01/2002, que possibilitou a continuidade da produção artesanal (MENEZES, 2011b).

Neste contexto, segundo Costa Júnior et al. (2014), a forma de padronização da produção de queijos artesanais, assim como todas as características de composição, ainda necessita de muita contribuição dos órgãos de pesquisa e inspeção sanitária. Também é necessário o apoio do governo para que a produção de várias regiões possa atingir os níveis de organização de outras regiões, como Serro e Canastra, que já se encontram mais estruturadas com associações e cooperativas de produtores, requisitando até a denominação de origem controlada (DOC), como acontece de forma crescente na Europa com produtos da mesma natureza.

2.1.1. Queijo Minas artesanal do Serro

A região do Serro é composta pelos municípios de Rio Vermelho, Serra Azul de Minas, Santo Antônio do Itambé, Serro, Materlândia, Paulistas, Guanhães, Virginópolis, Sabinópolis, Alvorada de Minas, Dom Joaquim, Conceição do Mato Dentro e Coluna (EMATER/MG, 2015).

A cidade do Serro é caracterizada por ricas tradições e valores culturais e é considerada histórica participante do Circuito Estrada Real (NUNES; MELLO, 2013). Com a população estimada em 20.940 habitantes (IBGE, 2020) é rodeado por serras e morros, banhados por rios e cachoeiras e apresenta-se como destino para apreciadores do turismo ecológico. É também uma referência importante do Caminho dos Diamantes que atraiu os Bandeirantes paulistas e nordestinos no século XVIII (SERRO, 2009). Essa região reúne condições geomorfológicas, edáficas e microclimáticas que propiciaram o surgimento de pastagens naturais, onde predominam o capim gordura e capins típicos de campos de altitude (MENESES, 2006).

Um dos produtos que mais traduzem a tradição e valor cultural do Serro é o QMA. Tradição esta, nos modos de fazer do queijo, que foi introduzida pelos colonizadores portugueses no passado (NUNES; MELLO, 2013).

Uma das características do QMA do Serro é ser produzido com leite cru, preservando história e sabor, registrado como 1º Patrimônio Cultural Imaterial de Minas Gerais (IEPHA, 2002).

Em 2008 foi reconhecido como Patrimônio Cultural do Brasil, pelo modo artesanal de fazer queijo de Minas. Esse bem imaterial constitui um conhecimento tradicional e um traço marcante da identidade cultural da região. A produção artesanal do queijo de leite cru representa uma alternativa bem-sucedida de conservação e aproveitamento da produção leiteira regional, em áreas cuja geografia limita o escoamento dessa produção (IPHAN, 2008).

No Serro desde 1985, ocorre o concurso de qualidade do QMA, com a finalidade de aperfeiçoamento e valorização do produto, envolvendo a participação de queijeiros da região e, hoje, devidamente cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). O tombamento da receita é considerado um fator para valorização da qualidade do produto, que inclui um plano de desenvolvimento regional para a inclusão da comunidade, assim como o registro de Indicação Geográfica (NUNES; MELLO, 2013).

Segundo Meneses (2007), em Minas Gerais, os produtores de queijos artesanais buscaram se associar, na tentativa de organizar, definir padrões e melhorar a qualidade microbiológica do produto, através do gerenciamento da produção e da comercialização, bem como de práticas sanitárias controladas para o rebanho e produção higiênicas. As organizações de produtores passaram a utilizar os sistemas das cooperativas regionais de produtores rurais, sobretudo no processo de padronização e comercialização do produto, considerando ainda a segurança alimentar com o apoio de instituições públicas, privadas e organizações não governamentais.

Sendo assim, o cooperativismo pode ser traduzido como um modelo socioeconômico que tem como pilares promover a melhoria econômica de seus parceiros e o bem social, através de uma distribuição mais igualitária dos rendimentos do negócio (VIEIRA; MAGALHÃES; FERREIRA, 2017).

2.1.1.1. Processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro

O QMA deve ser elaborado na propriedade leiteira, a partir do leite cru, integral, recém-ordenhado de vaca, obtido de um rebanho sadio e que atenda aos padrões de qualidade exigidos pela legislação estadual vigente. São utilizadas, em sua produção, técnicas tradicionais, sendo proibida a utilização de técnicas industriais, como ultrafiltração do leite, prensagem mecânica, emprego de leite concentrado ou em pó e proteínas láticas. O queijo deve ainda ser elaborado no interior de queijarias artesanais localizados em propriedade rural, destinadas exclusivamente à produção deste (MINAS GERAIS, 2012).

Além disso, as queijarias devem possuir áreas para recepção e armazenagem do leite, área de fabricação, de maturação e de embalagem e expedição e disporem de água para limpeza e higienização de suas instalações. Devem ainda estar localizadas, distante de pocilgas e galinheiros, possuírem barreiras de impedimento, por meio de cerca, do acesso de animais e de pessoas estranhas à produção e serem construídas em alvenaria, segundo normas técnicas estabelecidas em regulamento específico. Quando instalada junto ao estábulo ou local de ordenha, as queijarias devem possuir instalações, como torneiras higiênicas, separadas das usadas nos animais (MINAS GERAIS, 2012).

O fluxograma de fabricação do QMA do Serro pode ser visualizado na Figura 2, de acordo com informações dos produtores da região e adaptado de Martins (2006).

A produção do QMA deve ser iniciada, no máximo, noventa minutos após o começo da ordenha e é desenvolvida com a observância das seguintes fases: filtração do leite, adição de cultura láctica e coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem manual, salga seca e maturação (MINAS GERAIS, 2012).

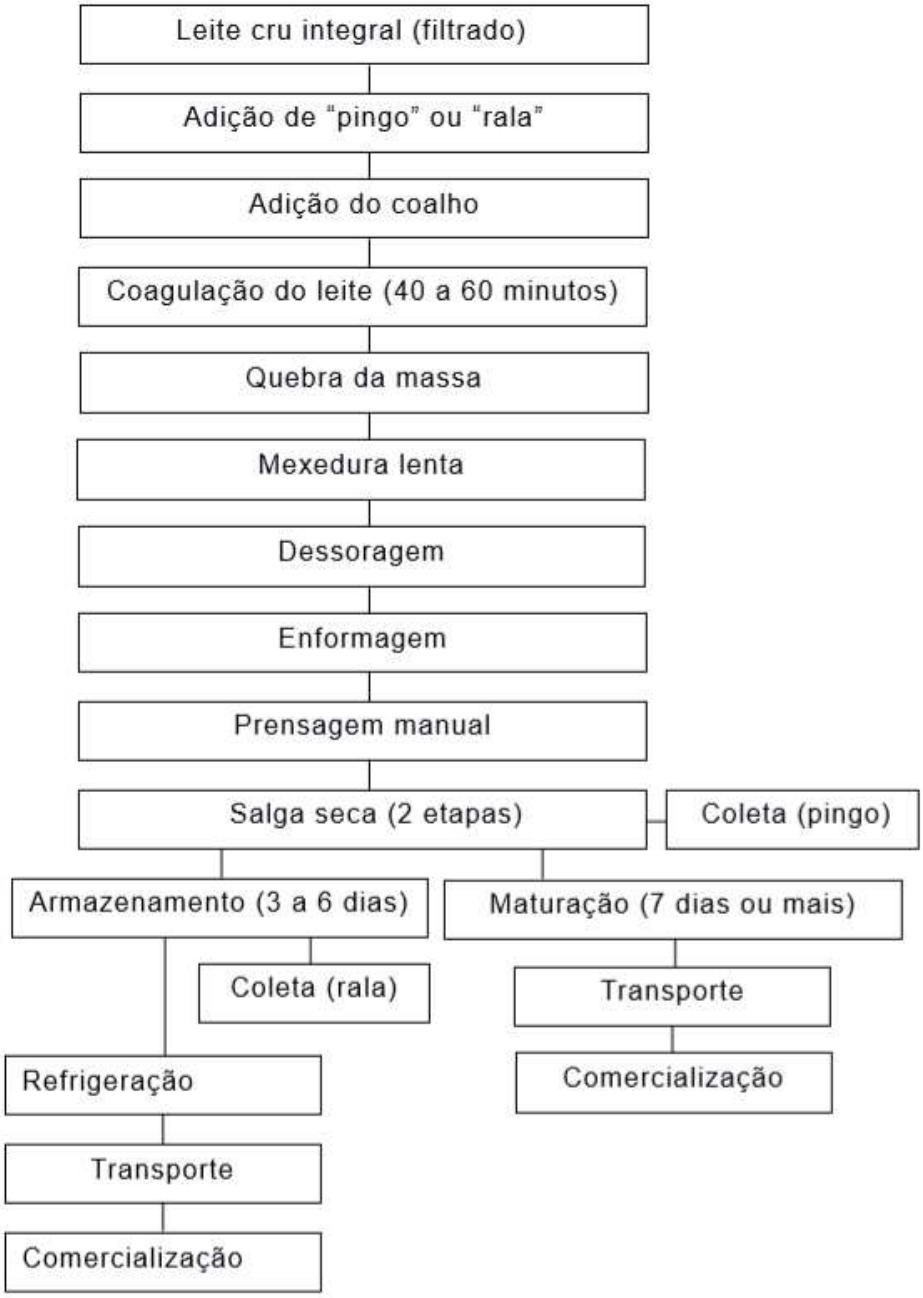


Figura 2 - Fluxograma do processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro.
Fonte: Adaptado de Martins (2006).

Após o processo da coleta do leite cru (recém-obtido por ordenha mecânica ou manual), este é filtrado e encaminhado para o interior da sala de processamento da queijaria, onde, então, será acondicionado em tanques para o início da produção. O coalho e fermento endógeno serão adicionados ao leite e, após sua coagulação, que

acontece em cerca de 40 a 60 minutos, inicia-se, o corte da coalhada com o auxílio de uma pá, régua ou lira rústica (MINAS GERAIS, 2012). De acordo com Pires (2003), a proporção adicionada de coalho, “pingo” e leite é importante para obtenção de uma coagulação adequada, em tempo certo, sem perda de elementos da massa e consequente interferência no teor de lipídios. A mexedura da massa deve ser de forma cuidadosa, por pouco tempo, seguida do processo de dessoragem. Esta massa é, então, colocada em formas plásticas de 13 a 15 cm de diâmetro, sendo o processo de espremedura e prensagem, manual. Este pode ser feito apenas com o uso das mãos (como na região do Serro) ou com a ajuda de um pano (como se faz na Serra da Canastra, na Serra do Salitre e no Cerrado), para eliminação do soro residual e modelação da forma final do queijo. Em seguida, a massa, ainda enformada, recebe a primeira salga, de sal fino ou grosso, em uma das superfícies. O queijo, após cerca de 6 a 8 horas, é virado e a outra superfície recebe uma camada de sal. Durante esse período, o “pingo” é coletado, para ser utilizado na produção posterior. Com 24 horas, o queijo é retirado da forma, o excesso de sal é descartado, e o produto segue para as prateleiras, em sala anexa, onde deve permanecer para o processo de maturação. O tempo de maturação ou cura varia de região para região, sendo necessários 17 dias para o QMA do Serro e 21 dias para o queijo da Canastra (IPHAN, 2008).

Durante o processo de maturação quando os queijos estão firmes, estes são colocados numa banca própria para o acabamento ou também chamado de “ralação”, o que se faz com auxílio de ralos de tampas de latas com orifícios feitos de pregos finos, de caco de telha ou de sabugo de milho queimado. Com a ralação obtém-se a rala, que é usada em pratos típicos da cozinha serrana como ótimo ingrediente de quitandas – biscoitos, pão de queijo e outros (PIRES, 2003). Por sua vez, a “rala", usada como fermento endógeno, é obtida pela ralação do queijo com 3 a 5 dias de fabricação, sendo utilizada em substituição ao “pingo”.

2.1.2. Fermento endógeno usado na fabricação do queijo Minas artesanal do Serro

A produção de queijos industriais diferencia-se da artesanal pelo fato de usarem processos mecanizados de produção e pasteurização do leite. Já a produção artesanal possui a obrigatoriedade da utilização do "pingo” (IMA, 2011).

O “pingo” é o soro fermento salgado que dá as características específicas aos queijos artesanais, é composto por um grupo de bactérias lacto fermentativas típicas de cada região. Ele é obtido com o soro que escorre dos queijos manufaturados durante a tarde e a noite do primeiro dia de maturação, sendo coletado da fabricação anterior para uso na fabricação do dia seguinte. É um acervo bacteriano próprio do leite, condicionado pelo clima, tipo de solo e pastagens de cada região, responsável pelo padrão de consistência, cor e sabor específico dos queijos (IPHAN, 2008; IMA, 2011).

O soro fermento “pingo” também denominado de fermento endógeno, composto por diversos grupos microbianos, selecionados de maneira aleatória e não intencional. Essa mistura de bactérias ácido láticas e de fungos filamentosos e leveduras resulta em um queijo com características microbiológicas, físico-químicas e aromáticas distintas. Um dos principais objetivos do seu uso em queijos artesanais está ligado à proteção do produto final contra a presença de microrganismos indesejáveis. Agem desta maneira através da produção de ácido ou de substâncias capazes de inibir a multiplicação de patógenos ou deteriorantes (MARINO; MAIFRENI; RONDININI, 2003; ARAÚJO, 2008). Entretanto ainda não há, na legislação vigente, padrões de qualidade para o “pingo” (OLIVEIRA, 2014).

Esses queijos tradicionais, por serem produzidos com a utilização do “pingo”, que varia de acordo com a característica da região, variam em suas características. Além disso, é comum não se adequarem aos parâmetros legais. Para que esses queijos tradicionais não percam seu espaço no mercado, é necessário que apresentem uma qualidade uniforme, sem que, contudo, se descaracterizem em relação ao produto tradicional (MACHADO; FERREIRA; FONSECA, 2004).

Em períodos mais frios, segundo Sobral et al. (2017), a temperatura do leite durante o processo de coagulação é mais baixa, devido à troca de calor com o ambiente. Sendo assim, muitos produtores utilizam uma dose maior de “pingo” nessas épocas, para que ocorra aumento na acidez titulável, permitindo melhores condições de coagulação e dessoragem da massa, compensando a temperatura mais baixa. Esse aumento na dose de “pingo” proporciona um aumento no número de bactérias endógenas, contribuindo, assim, com a fermentação.

A produção do QMA sempre se fez em formas e bancas queijeiras confeccionadas com madeiras nobres da região, não mais usadas há muitos anos, sendo substituídas por

formas plásticas, de higienização mais fácil. Produtores apoiados em pesquisas afirmam que a banca de madeira propicia uma troca microbiana imprescindível à maturação e segurança dos queijos artesanais de leite cru. Por imposição da legislação sanitária de 2002, as bancas de madeira têm sido substituídas por bancas de ardósia, granito ou aço inox. Segundo os produtores da região do Serro, essas inovações têm causado alterações no “pingo” (IPHAN, 2008).

Além disso, os produtores relataram também que essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem, resultando um produto com textura muito macia (BRUMANO, 2016).

Diante disso, alguns produtores de queijo artesanal da região do Serro, utilizam como fermento lático o próprio queijo artesanal, sendo ralado e adicionado ao leite, substituindo o “pingo”, sendo denominado pelos produtores como “rala” (FIGUEIREDO, 2014).

Esses produtores da região do Serro passaram a utilizar a “rala” na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, acreditando que a mesma possibilita maior dessoragem do queijo, deixando-o mais seco logo após a fabricação. Esta “rala” consiste em um queijo maturado (3 a 5 dias), produzido em um lote anterior, ralado, substituindo então o “pingo”, resultando em um queijo com dessoramento mais adequado e textura mais firme (COOPSERRO, 2017).

Embora a utilização da “rala” tenha solucionado o problema tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização desse fermento ainda não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar a alterações em suas características (BRUMANO, 2016).

A legislação brasileira exige o cadastramento das unidades produtoras ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e a implementação das boas práticas de fabricação (BPF) e boas práticas agropecuárias (BPA), para permitir a comercialização desses queijos de “pingo” de forma legal com 17 dias de maturação para a região do Serro. Com o cadastro realizado, o produtor passa a ser certificado e deve produzir seus queijos de acordo com as normas da legislação vigente, de forma a garantir a permanência das características tradicionais e os padrões higiênicos sanitários necessários para produção de um produto seguro (BRUMANO, 2016).

2.2. Maturação de queijos

A fabricação de queijos consiste de uma série de operações que vai desde a obtenção do leite até o último dia de maturação e expedição para o mercado. A qualidade do queijo depende diretamente da qualidade do leite, sendo necessário um controle rígido de qualidade durante todas as etapas de processamento. Por isso, é importante observar algumas propriedades do leite cru para o processamento do queijo, como: a composição do leite, mudanças do leite após sua produção (rancificação, oxidação, produção de ácido, desenvolvimento de *off-flavor*), leite anormal (mamite), contaminações, presença de resíduos (antibióticos, desinfetantes, metais), para se obter um produto final de qualidade (TEIXEIRA et al., 2014).

A maturação é um fenômeno complexo que envolve processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem na massa do queijo sob a influência de fatores ambientais e ácidos orgânicos e enzimáticos produzidos principalmente pela microbiota natural do leite (DOLCI et al., 2010; SIHUFE et al., 2010a).

Esse fenômeno modifica as propriedades químicas e físicas da massa do queijo, influenciando a textura e consistência e formando compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento do flavor característico de cada variedade de queijo (FOX; McSWEENEY, 1998).

Na maturação de queijos as enzimas convertem a lactose em ácido lático e a caseína em coalhada, transformando as proteínas e os açúcares, componentes responsáveis pelo aroma, sabor e textura do queijo maturado (TEIXEIRA et al., 2014).

A estrutura e a composição do queijo são determinadas pelo leite e pelo processo de fabricação, mas durante a maturação são definidas as características específicas de cada tipo de queijo. Além disso, outros fatores também contribuem nesta determinação, como a microbiota presente, principalmente oriunda do leite, do fermento e/ou pelos cultivos secundários. A intensidade e o produto da transformação dos constituintes da massa do queijo variam em função de cada tipo de queijo, além dos compostos que possam ser formados pelas enzimas presentes no queijo, sejam elas do próprio leite, do fermento e/ou do coalho. Dessa forma, controlando o processo de maturação podem-se desenvolver importantes características no queijo. Algumas destas características levam tempo para serem adquiridas, dependendo do tipo de queijo, o que torna o processo de maturação um gargalo econômico para muitas indústrias. A formação do sabor e da

textura está fortemente relacionado com pH, composição do leite e do queijo, da salga, da temperatura e umidade de maturação (TAMIME, 2006).

O acompanhamento do processo de maturação em queijos artesanais é importante e necessário, pois o QMA, embora seja muitas vezes consumido fresco, tradicionalmente é fabricado para ser consumido maturado, inclusive, em atendimento à legislação (BRASIL, 2013).

2.2.1. Proteólise em queijos

No aspecto bioquímico e sensorial, para a maioria dos queijos, a proteólise das caseínas é uma das principais alterações que acontece durante a maturação, pois contribui à redução da firmeza. Além disto, promove redução na atividade de água na matriz dos queijos decorrente da ligação entre a água livre e os grupos amino formados pela proteólise (McSWEENWY, 2004).

No leite bovino encontram-se vários tipos de proteases, sendo algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal, em consequência da alimentação, do estagio de lactação e de doenças como a mastite (FONSECA; SANTOS, 2000).

As principais proteases são a plasmina, plasminogênio, ativadores de plasminogênio, trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas de leucócitos (células somáticas). Algumas proteases são secretadas na forma de um precursor inativo. Sob condições fisiológicas, esses precursores são convertidos nas formas ativas por autólise (autoativação) ou por uma limitada proteólise por outra protease. Por exemplo, a plasmina é a forma ativa que é produzida a partir do zimógeno denominado plasminogênio. A conversão do plasminogênio em plasmina ocorre pela ação específica de ativadores do plasminogênio, os quais são também proteases. O resultado da atividade da plasmina é a quebra de cadeias de algumas proteínas lácteas especialmente a caseína (SILVA, 2004).

As peptidases e proteases que participam do processo de proteólise dos queijos podem estar presentes no leite cru, podem ser incorporadas pelo uso do coagulante e pelo desenvolvimento e proliferação de microrganismos (contaminantes ou do fermento), como bactérias láticas iniciadoras, bactérias láticas não iniciadoras e outros microrganismos Gram positivos. A atividade e quantidade destas enzimas, portanto,

podem variar e dependem das condições de processamento e de maturação, que se diferenciam pelo tempo, umidade relativa da câmara, atividade coagulante residual e da formação da microbiota (McSWEENEY, 2004; LIMA; PENNA, 2012). Algumas proteases são mais fortes, como a pepsina presente em coalho bovino ou originadas de bactérias psicrotróficas e, de sua quebra, podem originar peptídeos que formarão compostos amargos (LIMA; PENNA, 2012).

A maior parte da reação de proteólise ocorre devido à ação do coalho na maioria das variedades de queijo, sendo que a degradação das caseínas se deve às proteases microbianas residuais, provenientes do fermento, e de proteínas nativas do leite como a plasmina (ALAIS, 2003; FOX; McSWEENEY, 1998). Durante as reações, peptídeos hidrofóbicos podem ser produzidos, originando o gosto amargo, que consequentemente acabam sendo rejeitados por parte dos consumidores. Contudo, esses peptídeos e aminoácidos numa concentração adequada e balanceada com outros compostos, podem contribuir de forma positiva com a formação do *flavor* típico do queijo (FIGUEIREDO, 2014).

A proteólise é a quebra da proteína durante a maturação do queijo, que deve ser um processo controlado para resultar em compostos de sabor e odor desejáveis, ocorrendo em etapas. Na primeira etapa da proteólise ocorre a quebra das proteínas (caseínas) na fração α-S1 em peptídeos maiores, os quais serão posteriormente degradados em peptídeos menores, sendo que alguns podem ser amargos. A hidrólise da β-caseína e posteriormente hidrólise do peptídeo a peptídeos menores e aminoácidos, ocorre, principalmente, devido à atividade proteolítica da plasmina, da quimosina e enzimas bacterianas do fermento lático. Posteriormente, havendo uma quebra desses peptídeos menores, o sabor amargo desaparece e há liberação de aminoácidos que contribuem para o sabor do queijo, mas pouco influencia no aroma (HANSEN, 2006; ORDÓÑEZ, 2005).

2.2.2. Lipólise em queijos

A lipólise é considerada um evento bioquímico que ocorre durante o processo de maturação que pode contribuir com sabores desejáveis ou indesejáveis nos queijos (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003). A primeira alteração sofrida pelo conteúdo lipídico é a hidrólise dos triglicerídeos, com a liberação e acúmulo de ácidos graxos no

meio. Estes ácidos graxos contribuem com a formação de sabor e aroma do produto (ORDÓÑEZ, 2005).

Diante disso, queijos com maior teor de gordura apresentam um sabor melhor e mais rico, devido à presença de gordura lática. Além disso, a gordura interfere significativamente na textura do queijo, tornando-o mais macio. Durante o processo de maturação, parte da gordura é quebrada pelas lipases (enzimas originadas dos microrganismos do fermento ou adicionadas) e liberam compostos extremamente aromáticos, como os ácidos graxos. Em alguns casos, como em leite que contém alta contagem de psicrotróficos ou soro fermento com alta contagem de leveduras, ocorre uma lipólise intensa, levando a um sabor picante também intenso, podendo originar gosto de sabão. A lípase pode ser originaria do próprio do leite, adicionadas durante a fabricação do queijo, provenientes do coalho em pasta, do fermento, das culturas adjuntas, ou das bactérias não originadas do fermento (NSLAB), gerando como principais produtos os ácidos graxos voláteis de cadeia curta, incluindo o butírico, caprílico e cáprico (LIMA; PENNA, 2012; CRUZ et al., 2017).

Quando a lipólise proporciona sabores indesejáveis, é popularmente chamada de rancidez. A degradação da gordura durante a fabricação de queijos, que causa defeitos de sabor, pode ocorrer por meio da rancidez hidrolítica ou rancidez oxidativa (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003). Lipases extracelulares provenientes de alguns tipos de microrganismos podem promover a rancificação em manteiga, liberando ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis por *off-flavors*. No entanto, em outros produtos lácteos, como em queijos, certo nível de lipólise é desejável, pois contribui com a formação de sabor e odor desejável (ARAÚJO, 2008).

O ranço hidrolítico ocorre frenquentemente na formação de sabores indesejáveis no queijo. Este defeito acontece devido à ação das lipases (provenientes do leite ou de microrganismos) na gordura do queijo, com liberação de ácidos graxos livres de cadeia curta, como o butírico, caproico, caprílico e cáprico (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

Os ácidos graxos livres liberados durante a lipólise afetam diretamente o sabor do queijo, sendo metabolizados em outros compostos altamente aromatizados, incluindo metilcetonas e lactonas. A lipólise de glicerídeos do leite para ácidos gordurosos livres é essencial para o desenvolvimento de sabor no queijo. Os principais agentes lipolíticos no

queijo incluem a lipase a partir de leite cru, esterase pré-gástrica em queijos feitos com pasta de coalho e enzimas da microbiota iniciante e não iniciante. As bactérias do ácido lático são fracamente lipolíticas, mas em queijos maturados por longos períodos, liberam alguns poucos ácidos graxos, devido à atuação de suas lipases e esterases intracelulares (CRUZ et al., 2017; THIERRY et al., 2017).

2.2.3. Fatores que afetam a maturação de queijos

A extensão do processo de maturação dos queijos é determinada por fatores extrínsecos impostos pelas condições do ambiente onde os queijos se encontram para maturação como, a temperatura (temperaturas mais elevadas implicam numa taxa do amadurecimento mais acelerada), umidade relativa do ar (que controla a secagem dos queijos e seleciona a microbiota) e fatores intrínsecos ao queijo como pH, teor de sal e umidade na massa, assim também como o tipo de microrganismo(s) presente(s) de forma endógena ou presentes no fermento lático usado na fabricação, que vão desempenhar um papel importante na formação do sabor e textura dos queijos maturados (BANK, 1998).

Do ponto de vista técnico, a elevação da temperatura é considerada como o método mais simples para a aceleração do processo de maturação. No entanto, padrões estritos de higiene devem ser observados na fabricação de queijos com processo de maturação acelerado (SIHUFE et al., 2010a).

Deve-se salientar que a maturação deve ocorrer em temperatura ambiente e não sob refrigeração. Estudo comparando ambos os ambientes para maturação determinou que temperaturas abaixo de 8 °C não são suficientes para redução das contagens de microrganismos patogênicos, além de contribuir negativamente para a formação de compostos aromáticos no queijo (DORES; NÓBREGA; FERREIRA, 2013).

A influência do período de maturação nas características microbiológicas em queijos mantidos em temperatura ambiente pode determinar a microbiota, com diminuições nas contagens de coliformes e bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Listeria* (DORES; NÓBREGA; FERREIRA, 2013).

Em pesquisa com QMA da região da Serra da Canastra, queijos maturados em temperatura ambiente apresentaram baixas contagens de microrganismos indesejáveis, enquanto que aqueles maturados sob refrigeração permaneceram com contagens

elevadas (DORES et al., 2013). Segundo Brumano (2016), o QMA somente deve ser submetido à temperatura de refrigeração após ter sido maturado.

Pachlová et al. (2012), ao analisarem o efeito da temperatura elevada (16 °C) na maturação do queijo do tipo holandês em caves, observou que o aumento de temperatura em 6 ºC pode reduzir o tempo de maturação pela metade.

Ceruti, Zorrillam e Sihufe (2012), ao analisarem queijo Reggianito, observaram que o aumento da temperatura e do tempo de maturação resultaram em aumento dos produtos de proteólise, notadamente níveis mais elevados observado em queijos experimentais inicialmente armazenados a 20 °C durante 4 semanas.

A produção e qualidade de queijos artesanais também podem ser influenciados pelo período do ano, temperaturas e umidade relativa do ar, além da alimentação dos animais, determinando o produto final (OLIVEIRA, 2014).

No período da seca, em que as temperaturas encontram-se mais baixas quando em comparação ao período das chuvas, tal fator é desfavorável ao crescimento de microrganismos no queijo. Resultados confirmando menores contagens em maturação no período da seca foram vistos em QMA do Serro (MARTINS, 2006).

Al-Attar, Abou-Ghorrah e Haddal (2015), ao analisarem o efeito de altas temperaturas na aceleração da maturação de queijo kachcaval, observou que o uso de temperaturas elevadas levou à redução no teor de umidade, acelerou o processo de proteólise e reduziu o período de maturação.

Nos Estados Unidos, o queijo que é fabricado a partir de leite cru, precisa ser deixado maturando por pelo menos 60 dias a uma temperatura superior a 35 °C (BROOKS et al., 2012).

Martins et al. (2015) realizaram estudos em QMA de “pingo” fabricados nas regiões do Serro, os quais indicaram que a maturação à temperatura ambiente reduziram a contagem microbiana nos queijos, em 1/3 do tempo que os mesmos eram maturados sob refrigeração (8 ºC), realçando, ao mesmo tempo, as suas características de sabor. Nesse estudo ainda foi observado que 17 dias foi o tempo mínimo de cura, à temperatura ambiente, para reduzir a limites de segurança as contagens dos queijos em ambos os períodos de fabricação (estação seca e período chuvoso). Sob refrigeração de 8 ºC e UR de 75%, o tempo mínimo de maturação foi de 33 dias na estação seca e 63 dias na estação chuvosa.

O mundo todo tem buscado encontrar soluções para acelerar o período de maturação de queijo usando diferentes meios e métodos, para reduzir o custo de produção e acelerar o ciclo de capital (AL-ATTAR; ABOU-GHORRAH; HADDAL, 2015). Portanto, diferentes reações relacionadas com a maturação de queijos devem ser avaliadas (SIHUFE et al., 2010b).

Figueiredo (2014) avaliou as características do QMA do Serro produzidos em diferentes meses, e constatou-se que houve variação, ao longo dos meses, para pH, acidez, gordura, massa seca e atividade de água. Os resultados sugeriram que o teor de umidade, massa seca e gordura dos queijos são suscetíveis à umidade relativa do ar e variações nestes parâmetros influenciaram a firmeza, adesividade, atividade de água e cor. Nos queijos foram observadas maiores contagens de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus* sp. em janeiro e novembro, meses que apresentaram maior índice pluviométrico e temperatura mais alta.

2.3. Queijos: aspectos microbiológicos e de segurança alimentar

Os queijos são na maioria das vezes, produtos muito manipulados e, por isso, são passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiana. Estas condições podem ser agravadas, quando não se observam o tempo mínimo de maturação ou quando os queijos são processados com leite cru, sem o emprego das boas práticas e tecnologia adequada (PINTO et al., 2009).

O QMA é feito a partir do leite cru, o que aumenta o risco de multiplicação de microrganismos patogênicos. Diante disso, são requeridos muitos cuidados para que não ocorram contaminações que coloquem em risco a saúde humana (SOUZA et al., 2014). O QMA produzido na região do Serro, em Minas Gerais, é elaborado a partir de leite cru, sendo, portanto, um meio favorável ao crescimento de bactérias patogênicas (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007).

Dentre os principais microrganismos contaminantes de queijos e leites destacam-se os coliformes totais, termotolerantes, *Staphylococcus* sp., fungos filamentosos e leveduras, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. As bactérias do grupo coliforme são consideradas como os principais agentes causadores de contaminação associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos (OLIVEIRA et al., 1998; ALMEIDA; FRANCO, 2003).

Os coliformes são divididos em dois grupos, os coliformes totais e coliformes termotolerantes. O grupo dos coliformes totais é composto por enterobactérias que fermentam a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35 ºC. O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais e os microrganismos representantes desse grupo fermentam a lactose em 24 a 48 horas a 44,5 – 45,5 ºC, com produção de gás. Estes grupos de microrganismos não são indicadores de segurança de alimentos, mas podem indicar as condições de higiene dos processos de fabricação, já que são facilmente inativados pelos sanitizantes (SILVA et al., 2010).

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica, que pode causar intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas pré-formadas nos alimentos, quando ocorre a multiplicação das células (SILVA et al., 2010). A intoxicação por *Staphylococcus aureus* é a terceira causa mais comum de intoxicação alimentar no mundo (ACCO et al., 2003) sendo, também, uma importante fonte de contaminação de queijos artesanais (CARMO et al., 2002).

A contaminação inicial por *Staphylococcus aureus* pode ocorrer no leite produzido por animais com mastite. A manipulação excessiva durante a elaboração e processo de maturação do queijo também podem ser responsáveis pelas altas contagens encontradas nesse alimento (VIANA et al., 2009).

O estudo deste grupo de microrganismos em alimentos pode ser realizado com o objetivo de investigar seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar e para estimar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, condição em que é utilizado como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanitização das superfícies que entram em contato com alimentos (SILVA et al., 1997).

Fungos filamentosos e leveduras representam um grande grupo de microrganismos, pertencentes ao reino Fungi e, a maior parte deles, são originadas do solo ou do ar. Muitas espécies de fungos conseguem assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos, enquanto que as leveduras são mais exigentes, o que, de certa forma, limita os tipos de alimentos susceptíveis à deterioração por estas. Estes microrganismos são também bastante resistentes às condições adversas como pH ácido e atividade de água baixa. A faixa de temperatura ótima pra crescimento é de 25 a 28 ºC. Devido ao fato de necessitarem de oxigênio para o seu crescimento, os fungos deterioradores de alimentos podem ser considerados aeróbios estritos, enquanto que as

leveduras são capazes de crescer na completa ausência de O_2 e em diferentes concentrações de CO_2 (SILVA et al., 2010).

A contagem padrão de aeróbios mesófilos em placas pode ser utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias-primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Em algumas situações, pode ser usado para avaliar a qualidade, já que populações elevadas indicam deficiência na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SILVA et al., 2010).

Por outro lado as bactérias láticas têm como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido láctico. Todas são Gram positivas, não esporogênicas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas. O metabolismo de carboidratos pode ser homofermentativo, resultando primordialmente em ácido láctico, ou heterofermentativo, resultando em ácido láctico, CO_2 e outros produtos de fermentação (SILVA et al., 2010). Algumas bactérias láticas possuem atividade proteolítica, a qual é de grande importância no processo de maturação de queijos (PERRY, 2004).

Caracterizar a microbiota lática presente na água, no leite cru, no soro fermento e nos queijos elaborados, contribui para o conhecimento a respeito dos microrganismos desejáveis ao processo de elaboração do QMA, ao mesmo tempo em que auxilia na consolidação e preservação de sua identidade (CASTRO, 2015).

2.4. Queijos e seus aspectos físico-químicos

Durante a maturação dos queijos, há uma redução da atividade de água, devido à perda de água que também concentra o sal adquirido durante a salga, além de formação de ácido lático pelas bactérias o que contribui para a preservação do produto. Por outro lado, tem-se a redução do potencial de óxido redução e a presença de bacteriocinas produzidas pelas bactérias iniciadoras que restringem ou inibem o crescimento de microrganismos não *starters* (FOX et al., 2004).

A umidade é um dos parâmetros que indica o nível de maturação dos queijos, evidenciando neste caso que o tempo de maturação necessário para que a umidade alcance os níveis determinados pela legislação não esteja sendo respeitado pelos produtores (FERNANDES et al., 2011).

Segundo Ide e Benedet (2001), o teor de umidade de um alimento influencia diretamente na sua qualidade e as variações deste parâmetro em queijos podem estar ligado ao processo de produção, à quantidade e ao tipo de salga, bem como à pressão exercida no momento da prensagem. Para os autores, o tempo de maturação é outro fator que está diretamente ligado com o teor de umidade. O teor de umidade dos queijos pode influenciar na textura e no sabor do produto, sendo difícil de controlar quando se trata de fabricação artesanal.

A diminuição do teor de umidade contribui para a formação de casca no queijo. Em URA mais elevada, a casca formada no queijo será menos espessa, sendo este processo aplicado a queijos de casca lavada (LOURENÇO NETO, 2013).

Dos componentes do leite, o teor de gordura é o que mais varia em função da alimentação e também por outros fatores como a raça e genética (COELHO et al., 2010). Em relação ao teor de gordura, a legislação brasileira (BRASIL, 1996) classifica os queijos pelo seu teor de gordura no extrato seco (GES), podendo ser desnatados (< 10,0%), magros (10 a 24,9%), semigordos (25,0 a 44,9%), gordos (45,0 a 59,9%) e extragordos ou duplo creme (≥ 60,0%).

Conforme Lavasani et al. (2011), a relação entre nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) e nitrogênio total é indicativo do teor de peptídeos de cadeia curta e de aminoácidos. Entende-se, portanto, que quanto maior esta relação maior a intensidade da proteólise ao longo da maturação (GALÁN; CABEZAS; SALGUERO, 2012).

A acidez também é um importante parâmetro por influenciar o crescimento de microrganismos e a atividade enzimática ao longo da maturação (LAVASANI et al., 2011). Durante a maturação também se observa aumento da acidez titulável, redução do pH, redução no teor de lactose, dada a sua fermentação, com consequente produção de ácido lático (LAVASANI et al., 2011; GALÁN; CABEZAS; SALGUERO, 2012).

Outro importante parâmetro que caracteriza o queijo artesanal é a cor. De acordo com Perry (2004), a cor dos queijos está intimamente ligada à gordura do leite e, por esse motivo, pode sofrer variações sazonais. Costa Júnior et al. (2009), ao estudarem as variações do QMA da Canastra durante as estações do ano, verificaram que a sazonalidade influencia nos constituintes do queijo, sendo que apenas a gordura corrigida para matéria seca é mais constante e varia pouco percentualmente. Alguns fatores

utilizados para classificar os queijos são o método empregado na sua fabricação, tipo de leite utilizado, o tempo de maturação e a textura (FREITAS, 2015).

3. REFERÊNCIAS

ACCO, M.; FERREIRA, F.S.; HENRIQUES, J.A.P.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of Staphylococcus aureus colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 489-493, 2003.

ALAIS, C. **Ciencia de la leche: principios de técnica lechera**. 4. ed. Barcelona: Reverté, 2003. 873p.

AL-ATTAR, S.; ABOU-GHORRAH, S.; HADDAL, A. The impact of elevated temperatures on accelerating the ripening process of kachcaval cheese manufactured in Syria. **International Food Research Journal**, v.22, n. 4, p. 1519-1524, 2015.

ALMEIDA, P.M.P.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas frescal com pesquisa de patógenos importantes a saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 111, p. 79-85, 2003.

ARAÚJO, T. F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados de fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2008.

BANK, J.M. Cheese. *In*: EARLY, R. (ed.). **The Technology of Dairy Products**. London: Ralph Early, 2.ed. 1998. Cap.3, p. 81-122.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, Seção 3, p. 19. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos

Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União:** Seção 1, Brasília, DF, p. 3977, 11 de março de 1996.

BROOKS, J.C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R.; BROOKS, J.C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, U.M.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and preval ence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v.31, n.2, p.154-158, 2012.

BRUMANO, É. C. D. C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro–MG**. 2016. 136f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

CARMO, L. S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9 -14, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control,** v.18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CASTRO, R. D. **Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**: qualidade microbiológica e físico química em diferentes épocas do ano. 2015, 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

CERUTI, R. J.; ZORRILLAM, S. E.; SIHUFE, G. A. The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese**. Food Research International**, v. 48, n.1, p. 34–40, 2012.

CHR. HANSEN. **Maturação de queijos**. Biotec, Valinhos, n.92, p.6-10, 2006.

COELHO, S.G.; LIMA, J.A.M.; SILPER, B.F.; FRANZONI, A.P.S. Manipulação da composição do leite a partir de fatores nutricionais. **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v.2, n.2, 2010.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY, P. L.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 11, p. 841-866, 2003.

COSTA JÚNIOR, L.C.G.; MORENO, V.J.; MAGALHÃES, F.A.R.; COSTA, R.G.B.; RESENDE, E.C.; CARVALHO, K.B.A. Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.

CRUZ, A.G.; ZACARCHENCO, P.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H. **Processamento de produtos lácteos**: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas,

sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 387p.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K.; BERTOLINO, M.; COCOLIN, L. Microbial diversity, dynamics and activity throug hout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 71-75, 2010.

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C.L.L.F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 271-275, 2013.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, p.26-34, 2012.

DORES, M. T.; NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013.

EMATER. Empresa De Assistência Técnica E Extensão Rural Do Estado De Minas Gerais. **Mapa do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte, 2015. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_ver t&grupo=135&menu=59. Acesso em: 10 abr. 2016.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Medeiros inaugura o primeiro centro de qualidade do queijo Minas artesanal e será o primeiro município a vender o produto fora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2013. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas &id=11287#.WEnAB5XruP8. Acesso em: 10 abr. 2016.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Programa Queijo Minas Artesanal é referência para outros estados**. Belo Horizonte, 2017. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite_pagina_in terna &id=21494. Acesso em: 13 nov. 2017.

EMATER. Empresa De Assistência Técnica E Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Documento de caracterização da região do Serro/MG como produtora de queijo Minas artesanal**. Serro, 2002. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORIC O/dossi%C3%AA%20do%20serro%20def2.pdf. Acesso em: 15 mai. 2017.

FERNANDES, R. V.; BOTREL, D. A.; ROCHA, V. V.; SOUZA, V. R.; CAMPOS, F. M.; MENDES, F. Q. Avaliação físico-química, microbiológica e microscópica do queijo artesanal comercializado em Rio Paranaíba-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 21-26, 2011.

FIGUEIREDO, S.P. **Características do leite cru e do queijo minas artesanal produzidos na região do Serro, Minas Gerais e, produção de queijos com doces.** 2014. 108f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Chemistry and biochemistry of cheese. *In*: FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. (ed.). **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 10, p. 403-418.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. Cheese: An Overview. *In*: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3. ed. London: Elsevier Academic Press, v.1, 2004. p.1-2.

FREITAS, M.P. Avaliação microbiológica de queijos artesanais produzidos na cidade de Taió, Santa Catarina. **Revista Interdisciplinar Saúde e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 103-114, 2015.

GALÁN, E.; CABEZAS, L.; SALGUERO, J. F. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon Cynara cardunculus, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v.25, n.2, p.92-96, 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2017. Disponível em: https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/panorama. Acesso em: 20 dez. 2017.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

IEPHA. INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. Patrimônio cultural protegido. Bens registrados. **Modo de fazer o queijo artesanal da região do Serro.** 2002. Disponível em: http://www.iepha.mg.gov.br/index.php/programas-e-acoes/patrimonio-cultural-protegido/bens-registrados/details/2/4/bens-registrados-modo-de-fazer-o-queijo-artesanal-da-regi%C3%A3o-do-serro 2002. Acesso em: 15 dez. 2020.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: http://www.ima .mg.gov.br/certificação/queijo-minas-artesanal-link. Acesso em: 18 abr. 2016.

IPHAN. INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTORICO E ARTÍSTICO NACIONAL. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. **Certidão de registro do modo de fazer do queijo de Minas, nas regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre** de 13 de jun.

2008. Brasília: Departam ento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2008. 2 p.

LAVASANI, A. R. S.; EHSANI, M. R.; MIRDAMADI, S.; MOUSAVI, M. A. E. Z. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, n.1, p.64-70, 2011.

LIMA, M.S.; PENNA, L.P.C. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos.** Belo Horizonte: Emater, 2012, 68p. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/livrariavirtual/a015.pdf . Acesso em: 21 mai.2018

LOURENÇO NETO, J.P.M. **Queijos – Aspectos Tecnológicos**. 1.ed. São Paulo: Master Graf., 2013. 270p.

MACHADO E. C.; FERREIRA, C.L.L.F.; FONSECA, L.M. 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.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. 2006. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time at room temperature and under refrigeration of Minas artisanal cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p.127-144, 2004.

MENESES, J. N. C. **Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil.** Dossiê Interpretativo. Belo Horizonte: Ministério da Cultura, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, v.1, 2006. 139p.

MENESES, J.N.C. Modos de fazer e a materialidade da cultura “imaterial”: o caso do queijo artesanal de Minas Gerais. **Patrimônio e Memória**, v. 5, n. 2, p. 19-33, 2007.

MENEZES, S.S.M. Queijo Artesanal: Identidade, Prática Cultural e Estratégia de Reprodução Social em Países da América Latina. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, n. 47E, 2011a.

MENEZES, S.S.M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)**, v.28, n.1, p 40-56, 2011b.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Diário do Executivo**. Belo Horizonte, 18 dezembro de 2012.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte, MG, 2013.

NUNES, K.S.; MELLO, R.C. Um estudo de caso sobre a indicação geográfica como estratégia para comercialização do queijo Minas artesanal do Serro. **Santa Luzia**, v. 2, n. 1, p.1-20, 2013.

OLIVEIRA, C. A. F. D.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P. M. L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo**. Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31-5, 1998.

OLIVEIRA, L. G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. 2014. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ORDÓÑEZ, P. J. A. **Tecnologia de Alimentos – Origem Animal I**. São Paulo: Artmed, 2005. 279 p.

PACHLOVÁ, V.; BUŇKA, F.; FLASAROVÁ, R.; VÁLKOVÁ, P.; BUŇKOVÁ, L. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. **Food chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1846-1854, 2012.

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

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. D. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. D. S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, n.4, p.342-347, 2009.

PIRES, M. C. S. **Produção artesanal do queijo do Serro**. 2003.

SERRO. PREFEITURA DE SERRO. Principal. Galeria de vídeos. **Serro é um município brasileiro do estado de Minas Gerais.** 2009. Disponível em: https://www.serro.mg.gov.br/portal/0/galeria-de-videos/8/Serro-%C3%A9-um-munic%C3%ADpio-brasileiro-do-estado-de-Minas-Gerais. Acesso em: 15 dez. 2020.

SIHUFE, G. A.; ZORRILLA, S. E.; PEROTTI, M. C.; WOLF, I. V.; ZALAZAR, C. A.; SABBAG, N. G.; RUBIOLO, A. C. 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, 2010a.

SIHUFE, G.A.; ZORRILLA, S.E.; SABBAG, S.C.; COSTA, S.C.; RUBIOLO, A. The influence of ripening temperature on the sensor characteristics of Reggianito argentino cheese. **Journal of Sensory Studies**, v.25, n.1, p.94– 107, 2010b.

SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J.O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.214-21, 2010.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação**. Juiz de Fora, 2004. 128p.

SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico química do leite e derivados – Métodos analíticos.** Juiz de Fora: Ed. Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; TEODORO, V. A. M.; MOREIRA, G. D. M. M.; PINTO, M. S. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

SOUZA, B. L.; SANTOS, E. M. P.; BAPTISTA, E. B.; SILVA, C. D. S. F. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em Amostras de Queijo Minas Artesanal. **Blucher Food Science Proceedings**, v.1, n.1, p. 379-380, 2014.

TAMIME, A. Y. **Brined Cheese.** Lowa: Blackwell Publishing, 2006. Disponível em: http://books.google.com/books. Acesso em: 20 de maio de 2017.

TEIXEIRA, M.V.; FRANCEZ, Y.; COLA, A.P.; OLIVEIRA, D.V.; SILVA, E.; MUTRAN, T.J. Detecção da presença de amido em queijos do tipo prato e mozarela. Presence detection of starch in mozzarella and “prato” cheeses. **Science In Health,** v. 5, n. 2, p. 79-85, 2014.

THIERRY, A.; COLLINS, Y.F.; MUKDSI, M.C.A.; McSWEENEY, P.L.H.; WILKINSON, M.G.; SPINNLER, H.E. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. **Chemistry, Physics and Microbiology**, p. 423– 444, 2017.

VIANA, F. R.; OLIVEIRA, A. F.; CARMO, L. S.; ROSA A.C. Occurrence of coagulase-positive Staphylococci, microbial indicators and physical - chemical characteristics of traditional semihard cheese produced in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n. 3, p. 372-377, 2009.

VIEIRA, E. M.; MAGALHÃES, E. N.; FERREIRA, M. P. Viabilidade econômica para implantação de agroindústria de laticínio numa cooperativa de Urutaí-Goiás. *In*: SEMINÁRIO DE PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA-SEPIT, 2017. **Anais** [...]. v. 1, n. 1, 2017.

CAPÍTULO 11 - LARVA DE *Tenebrio molitor* COMO FONTE DE PROTEÍNA NA ALIMENTAÇÃO HUMANA: POSSIBILIDADES E PERSPECTIVAS

Maria Aparecida Senra Rezende
Cleuber Antônio de Sá Silva
André Narvaes da Rocha Campos

1. INTRODUÇÃO

A entomofagia é um fenômeno historicamente antigo e geograficamente disseminado. Existem relatos de que o povo Asteca conhecia e consumia mais de 91 espécies de insetos, preparando-os de diversas formas ou utilizando-os como condimento (RAMOS-ELORDUY; PINO, 1996). Estima-se que mais de dois e meio bilhões de pessoas em todo o mundo consomem insetos (COSTA-NETO, 2003).

Insetos apresentam importância nutricional e econômica em vários países (ILLGNER, 2000). Neste contexto, existe grande diversidade de espécies com relatos de entomofagia nos diferentes continentes: 524 espécies na África, 349 na Ásia, 679 nas Américas, 41 na Europa e 152 espécies na Austrália (RAMOS-ELORDUY, 2005). O México tem o maior número de espécies registrado, seguido pela Tailândia, Congo e Zaire, Índia, Austrália, China e Zâmbia (CERRITOS, 2009).

Em regiões subdesenvolvidas a subnutrição é um problema enfrentado por um grande número de pessoas, especialmente a desnutrição proteico-energética (PEM). Desta forma, estudos sobre fontes alternativas de alimentos de maior valor nutricional agregado são relevantes para superar este problema. As comunidades rurais da Tailândia, onde habita mais da metade da população deste país, têm uma longa história cultural ligada ao consumo de insetos. Nestas regiões, as limitações sócio culturais e econômicas, muitas vezes prejudicam a utilização das fontes de proteínas mais comuns para os ocidentais, como carne de porco, carne bovina, aves, leite e ovos (YHOUNG-AREE; PUWASTIEN; ATTIG, 1997).

Embora haja uma relutância dos ocidentais para comer insetos (VAN HUIS et el., 2013), muitas culturas no mundo os consomem regularmente e os mesmos contribuem com montantes significativos do seu consumo total de proteína (DEFOLIART,1999).

O Brasil é reconhecido mundialmente por sua biosociodiversidade, considerando sua biodiversidade (MYERS et al., 2000), e sua rica diversidade cultural, com vários

grupos étnicos como comunidades indígenas, ribeirinhos da Amazônia e quilombolas. Neste contexto, pode-se inferir que a antropoentomofagia é subestimada, considerando a disponibilidade de insetos potencialmente comestíveis e a diversidade de culturas pouco conhecidas (COSTA-NETO; RAMOS-ELORDUY, 2006).

Foram documentados no Brasil a existência de 135 espécies de insetos comestíveis, pertencentes a 9 ordens e 23 famílias em 14 dos 26 estados da Federação. Destes, 95 foram identificados para o nível de espécie e 18 para o gênero, enquanto outros são conhecidos apenas por seus nomes nativos. As ordens mais consumidas são Hymenoptera (63 por cento), Coleoptera (16 por cento) e Orthoptera (7 por cento) (COSTA-NETO; RAMOS-ELORDUY, 2006).

O mercado de insetos comestíveis está atualmente em expansão no Brasil, tanto para alimentação humana, como também para alimentação animal (TUNES, 2020). A falta de cultura de entomofagia reflete-se na legislação da área de alimentos, tendo em vista que hoje não há uma legislação vigente para regulamentar a produção e a avaliação dos parâmetros de qualidade deste tipo de alimento.

2. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DOS INSETOS COMO ALIMENTOS

Dentre as características nutricionais dos insetos, destaca-se a concentração de proteínas, pois a mesma é comparável à proteína da carne de vertebrados (RAUBENHEIMER et al., 2014). Além disso, a qualidade da proteína de insetos é, muitas vezes, próxima à da carne, com composição de aminoácidos essenciais que pode fornecer de 46 a 96% das necessidades diárias do ser humano (FINKE, 2013), como observa-se na Tabela 1.

Tenebrio molitor já é criado em escala industrial (VAN HUIS et al., 2013). A China os vende em tamanhos comum e gigante, vivos, secos, enlatados e como pó para gado, peixes e animais de estimação (VELDKAMP et al. 2012), sendo também muito utilizado para consumo humano (TANG; DAI; LIU, 2010). Insetos são vendidos também na Holanda para animais de jardim zoológico e de *pets shops*, tais como aves, répteis, mamíferos e anfíbios. No entanto, estes métodos são demasiadamente caros e

economicamente inviáveis para a alimentação em larga escala de aves e suínos (VELDKAMP et al. 2012).

Tabela 1. Teores de aminoácidos essenciais de insetos comestíveis tailandeses (mg/100 g de peso seco) e as necessidades diárias para os seres humanos (mg/Kg de peso corporal por dia)

Inseto	Aminoácido essencial								
	Ile	Leu	Lys	Met+ Cys	Phe+ Tyr	Thr	Trp	Val	Escore
Grilo	29,8	60,9	46,0	30,9	62,4	29,0	34,4	34,4	68,7
Bicho-da-seda	46,1	70,6	77,2	36,3	122,0	45,3	52,2	52,2	100,0
Gafanhoto	32,7	59,5	35,7	20,9	60,0	22,3	35,6	35,6	55,8
Lagarta do Bambú	33,9	60,0	56,0	41,8	100,8	34,9	38,8	38,8	77,5
Besouro junho	32,1	51,8	18,8	44,6	49,3	26,9	29,3	29,3	34,2
Necessidades diárias para seres humanos (OMS / FAO)*									
Pré-Escolares	28	66	58	25	63	34	11	35	-
Adultos	13	19	16	17	19	9	5	13	-

Fonte: Adaptado de SIRIAMORNPUN; THAMMAPAT, 2008. Ile: isoleucina, Leu: Leucina, Lys: Lisina, Met: Metionina, Cys: cisteína, Phe: Fenilalanina, Tyr: Tirosina, Thr: treonina, Trp: triptofano e Val: Valina. * Padrão FAO 1985.

Com relação ao sabor dos insetos, gafanhotos já foram comparados a “camarões-do-mato” e adquirem o sabor de qualquer tempero usado durante o preparo (CARRERA, 1992). Na Tailândia pratos finos são preparados com vários tipos de insetos como apresentados no Quadro 1.

3. ASPECTOS AMBIENTAIS RELACIONADOS À ENTOMOFAGIA

A criação de insetos, quando otimizada, pode levar a menor emissão de gases de efeito estufa, quando comparada à criação de porcos ou gado. Além disso, a criação de insetos apresenta maior eficiência na transformação de alimentos em proteína. Estas criações, ainda apresentam a vantagem de serem de baixa tecnologia e requererem baixo investimento de capital para sua implementação (VAN HUIS et al., 2013).

Oonincx e de Boer (2012) quantificaram a produção de gases de efeito estufa (GEE) e uso de energia em toda a cadeia de produção de larvas de *T. molitor.* Neste estudo, constatou-se que o uso de energia para a produção de 1 kg de proteína por larvas de farinha foi menor do que a energia necessária para a produção da mesma quantidade de carne bovina; foi comparável com carne de porco; e um pouco maior do que para frango e leite.

Quadro 1. Características do preparo de larvas de insetos na Tailândia.

Inseto	Modo de Preparo
Cigarra	Picado cozido
Besouro	*Curry*, pasta de pimentão, frito
Barata d`água gigante	Pasta do pimentão, assado
Grilo	Cozidos, *curry*, frito, assado
Besouro de junho	Assado, frito, cozido no vapor, ao *curry* com legumes
Percevejo	Assado, *curry*, pasta de pimentão
Gafanhoto	Vapor, frito, assado
Cupim	Assado (com sal), frito
Besouro d`água verdadeiro	Assado, levemente ao *curry*, frito
Besouro d`água necrófago	Levemente ao *curry*, frito
Salada de formiga tecelã	Levemente ao *curry* com legumes
Bicho da seda (pupas)	Frito, cozido no vapor, com pasta de pimentão, *curry*
Lagarta do bambu	Frito, pasta de pimentão, ao *curry* com legumes
Rainha casta	Cozidos com pasta de caril, salada tailandesa picante

Fonte: Modificado de SIRIAMORNPUN; THAMMAPAT (2008).

Já com relação à emissão de GEE, a produção de larvas de *Tenebrio* foi muito menor que para produção de outros animais. Comparativamente, para cada 1 ha de terra necessária para produzir proteínas das larvas seriam necessários 2,5 ha para produzir uma quantidade semelhante de proteína do leite, 2 a 3,5 para produzir uma quantidade similar de proteína de porco ou frango e 10 ha para produzir uma quantidade similar de proteína de carne bovina. Portanto, as larvas de *Tenebrio molitor* são uma fonte de proteína com menor custo ambiental, quando comparado ao leite, frango, porco e carne bovina (VAN HUIS et al., 2013).

Outro aspecto é a possibilidade de utilização de insetos para destinação de compostos resistentes à biodegradação na natureza. Yang et al. (2015) realizaram experimentos com o poliestireno (PS), que geralmente é durável e resistente à biodegradação, utilizando larvas de *Tenebrio molitor* que após comer o isopor, foi degradado no intestino das mesmas dentro de um tempo de retenção de menos de 24 horas. Alimentados com isopor como a única dieta, as larvas sobreviveram como aquelas alimentadas com uma dieta normal (farelo) ao longo de um período de 1 mês. A análise

das excretas a partir da alimentação com isopor, comprovou a clivagem/despolimerização de moléculas de cadeia longa e houve formação de metabólitos despolimerizados no intestino das larvas. Dentro de um período de teste de 16 dias, 47,7% do carbono ingerido no isopor foi convertido em CO_2 e o resíduo (cerca de 49,2%) foi excretado como fécula com uma fração limitada constituída em biomassa. A descoberta da rápida biodegradação do poliestireno no intestino das larvas revela uma nova possibilidade de destinação para os resíduos de plástico no meio ambiente. Este resultado é interessante pois demonstra a capacidade de *T. molitor* em transformar materiais de descarte em proteína de qualidade nutricional.

Segundo a FAO, insetos para alimentação humana e animal não foram testados o suficiente para determinar o risco de transmitir doenças, porém como são taxonomicamente muito mais distantes dos humanos do que os animais como o gado, espera-se que o risco de infecções desta natureza seja baixo (VAN HUIS et al., 2013).

A preocupação sanitária é uma questão que levanta muitas dúvidas quanto ao consumo de insetos. No entanto, é relatado que muitos insetos apresentam defesas naturais contra fungos e bactérias o que é um indício importante de que estes têm baixa propensão em transmitir zoonoses. A fim de sobreviver aos microrganismos patogênicos, os insetos dependem tanto das barreiras físicas quanto das condições locais, sistêmicas e respostas imunes (JACOBS et al., 2016).

Recentemente foi demonstrado que a infecção de *Tenebrio molitor* por *Beauveria bassiana* ativou a expressão de alguns peptídeos antimicrobianos que levou a diminuição da sobrevivência deste fungo (YANG et al., 2017), um entomopatógeno que infecta uma ampla gama de hospedeiros (FERRON, 1978; HAJEK; MEYLING, 2018). Em um estudo realizado com ovos de *Tenebrio,* estes quando inoculados com *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, são capazes de uma resposta imune endógena tanto quanto no besouro adulto, e indicam que tais respostas de indução em ovos são provavelmente comuns em insetos (JACOBS et al., 2016).

4. RESTRIÇÕES AO CONSUMO DE INSETOS

Pessoas que apresentam reações alérgicas a crustáceos, como camarão, lagosta e caranguejo, apresentam restrições ao consumo de insetos (VAN HUIS et al., 2013). Os alérgenos sensibilizantes podem ser comuns entre estes organismos, tais como a

tropomiosina de crustáceos ou a arginina quinase de artrópodes, não descartando a existência de alérgenos específicos de insetos (BELLUCO et al., 2013). Insetos de modo geral, podem causar reações alérgicas, como eczema, rinite, conjuntivite, angioedema e asma brônquica, porém as reações alérgicas mais familiares aos insetos são causadas por picadas como as abelhas ou vespas (EFSA, 2015).

Além das reações alérgicas, que muitas vezes são determinadas por características intrínsecas do consumidor, é necessário cuidado para distinguir os insetos que são comestíveis das espécies tóxicas, o que demanda conhecimento para evitar danos sérios para a saúde dos consumidores. Neste contexto, temos os criptotóxicos que causam intoxicação quando são ingeridos e os farenotóxicos que possuem aparelho inoculador de peçonha (COSTA-NETO, 2003).

As restrições alimentares à insetos também podem ser atribuídas à presença material contaminante, como por exemplo metais pesados. No entanto, as concentrações de metais pesados e de arsênio em insetos depende das características dos elementos e suas concentrações nos substratos utilizados para criação, das espécies de insetos e sua trajetória de crescimento (EFSA, 2015), portanto o cuidado com a alimentação dos insetos é de fundamental importância para evitar contaminação com estes elementos.

5. *Tenebrio molitor*: ASPECTOS GERAIS

Tenebrio molitor é um inseto pertencente à ordem *Coleoptera* e família *Tenebrionidae,* é um besouro que tem ciclo de vida curto (LI; ZHAO; LIU, 2012) e com alto número de descendentes (VAN HUIS et al., 2013). Apresenta metamorfose completa dividido em 4 fases: embrião (ovos), larva, pupa e ímago (adulta) (SPANG, 2013). A Figura 1 mostra o ciclo do besouro *Tenebrio molitor*.

A larva do *Tenebrio molitor* alimenta-se de farelo de trigo, cenoura, cana-de-açúcar e de embalagens de celulose. Baek et al. (2015) observou que as larvas de *Tenebrio molitor* também podem se alimentar de vegetais com altos teores de umidade em laboratório. Há muitos estudos que investigaram *Tenebrio molitor* como alimento, uma vez que é uma espécie comumente criada em todo o mundo (MLCEK et al, 2014) e vários estudos têm mostrado que a composição do mesmo é adequada para uso como alimento (YI et al., 2013; YOO et al., 2013).

Figura 1: Ciclo do besouro *Tenebrio molitor.*

Fonte: A, B, C, D, E, F. própria da autora, G – Ovos (JACOBS et al., 2016).

5.1. Aspectos nutricionais e funcionais

Um dos aspectos importantes de *Tenebrio molitor* como alimento é seu teor alto de proteínas, que apresenta em média 58%. O suprimento de proteínas é de fundamental importância para o desenvolvimento humano, pois a deficiência de proteínas pode levar a alterações como doenças ósseas e nanismo (FAO, 2007). Pesquisadores mexicanos o utilizam em pó que, adicionado à farinha de milho, permite fazer tortilhas nutritivas, enriquecidas de proteínas e bem aceitas pelos consumidores (AGUILAR-MIRANDA et al., 2002).

O teor de fibra existente nos insetos deve-se às proteínas da cutícula e à quitina que se encontra em uma matriz com as proteínas cuticulares, lipídeos e outros componentes, que formam a endo- e exocutícula dos insetos (FINKE, 2007). Na quitina do *Tenebrio molitor* adulto encontra-se alta concentração de glicina, enquanto que na fase larva e pupa encontra-se alanina (ANDERSEN et al., 1973). Porém, seu consumo na forma adulta não é aconselhável pela presença de quinonas, potencialmente cancerígenas e mutagênicas (SUPERIOR HEALTH COUNCIL, 2014). As proteínas da

quitina das larvas e pupas de *Tenebrio molitor* têm muitos aspectos semelhantes às proteínas da quitina de gafanhotos adultos (ANDERSEN et al., 1973).

Segundo Han et al. (2016) *Tenebrio molitor* apresenta altas concentrações de magnésio, fósforo e potássio, contribuindo para o metabolismo de aminoácidos que depende de um estado nutricional adequado para estes nutrientes (JACKSON, 1999). Tradicionalmente, na China, essas larvas são usadas como suplementos, pois são ricas em vitaminas, minerais, ácido linolênico, entre outros (TANG; DAI; ZHOU, 2012). No entanto, deve-se ponderar que quantidades inadequadas de vitaminas do complexo B ou zinco poderão influenciar o valor biológico de uma proteína. Por exemplo, o excesso de zinco induz a síntese de metalotioneína, que pode aumentar a demanda por aminoácidos sulfurados, enquanto a síntese de ferritina em resposta ao excesso de ferro pode desviar aminoácidos de outras funções, como o crescimento (FAO, 2007). Deste forma, *Tenebrio molitor* deve ser bem avaliado nutricionalmente por fornecer proteínas e outros nutrientes para seus consumidores.

Considerando suas características nutricionais, *Tenebrio molitor* vem sendo cada vez mais pesquisado como fonte de proteínas para cultivo no espaço com o objetivo de alimentar astronautas. Em sistemas de suporte à vida biorregenerativa, os membros da tripulação precisam de animais para sua ingestão de proteínas a fim de atender às necessidades nutricionais e cujo cultivo traga menos transtornos para a sobrevivência durante longos períodos (LI; ZHAO; LIU, 2012; LI et al., 2016).

Tenebrio molitor pode apresentar uso terapêutico para tratamento de câncer e efeito imunomodulatório positivo. Como uso terapêutico temos como exemplo os efeitos citotóxicos de extrato de larva de *Tenebrio molitor* contra carcinoma hepatocelular. Lee et al. (2015) observaram que a forma larvária contém substâncias citotóxicas que afetam a viabilidade das células do câncer (tumorogênese ou carcinogênese). A tumorogênese está associada com vários eventos pelo qual uma célula normal transforma-se em uma célula cancerígena por aumento da taxa de proliferação. Os oncogenes e genes supressores de tumores estão diretamente envolvidas no ciclo celular, incluindo a diferenciação e a apoptose. Uma perda de controle na fase G1 do ciclo celular conduz a proliferação descontrolada de células (FLORES; SOBREVIA, 2000).

Evitar a etapa morte do ciclo celular e a capacidade para burlar o sistema imunológico são características das células cancerígenas. Estas são alvo de drogas com

mecanismos de ação diversos. Em estudo recente Lee et al. (2015) realizaram análises *in vitro* e *in vivo* do extrato da larva de *Tenebrio molitor*. A atividade anticancerígena *in vivo* da fração de hexano contendo o extrato da larva foi avaliada em relação à medição do volume do tumor. As células SK-HEP-1 foram implantadas por via subcutânea em ratos novos. Quando o tamanho do tumor atingiu cerca de 180 mm^3, 1 g/kg de fração de veículo com extrato da larva foi administrado por via intraperitoneal. No final do experimento, constatou-se a redução do volume do tumor (LEE et al., 2015). Após 15 dias de tratamento com a fração hexano, o peso corporal médio dos ratos foi também comparado, não havendo perda de peso significativa. Concluiu-se que os extratos de larvas de *Tenebrio molitor* contêm substâncias citotóxicas, que podem ser enriquecidas por protocolos adequados de fracionamento, e posterior separação e purificação levando à identificação de novas moléculas para o tratamento de câncer em seres humanos (LEE et al., 2015).

Há um interesse crescente na identificação e caracterização de insetos com atividade imunomoduladora. Larvas de *Tenebrio molitor* têm sido amplamente utilizadas como medicamentos tradicionais dos chineses e suplemento alimentar de humanos e animais (TANG; DAI; LIU, 2010). Neste estudo, verificou-se que a ingestão de insetos não só era segura para os ratos, mas também era eficaz contra fadiga, retardava o envelhecimento, diminuía o nível de colesterol total e a taxa de microcitose em eritrócitos policromáticos (TANG; DAI; LIU, 2010).

5.2. Avaliação da toxidez em dietas baseadas em insetos

O objetivo principal dos estudos toxicológicos é a predição dos possíveis efeitos adversos que podem ser manifestados quando da exposição humana à determinada substância química (STOKES, 2002; MEYER, 2003). Embora não exista uma legislação específica que preconize estudo de toxicidade para alimentos compostos por insetos, o GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 407 (OECD, 2008), fornece um roteiro geral para estudos de neurotoxicidade e imunotoxicidade de agentes químicos. No Brasil a ANVISA preconiza para análises de toxicidade de fitoterápicos em animais de acordo com a Resolução 90/2004.

Neste contexto, o estudo com cobaias fornece uma visão ampla dos potenciais efeitos de um dado produto nos organismos vivos. Neste contexto, os efeitos dos

compostos são avaliados por meio da necropsia e análise dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos, hematológicos, imunológicos e histopatológicos. As análises bioquímicas têm a finalidade de avaliar as funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos e tecidos, bem como identificar patologias ocultas (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

Os exames bioquímicos disponíveis na prática clínica avaliam as funções renal, hepática, cardíaca e pancreática, bem como evidenciam alterações no equilíbrio hídrico, eletrolítico e de minerais, determinam ainda alterações no metabolismo endócrino e da atividade muscular (BERGONSO, 2007). A avaliação renal é determinada pela mensuração de uréia e creatinina. A uréia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo juntamente com a creatinina utilizada para avaliar funções renais (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

O aumento da taxa de creatinina no sangue ocorre em todas as patologias renais em que há diminuição da filtração glomerular. A dosagem de creatinina deve ser realizada em paralelo com a de ureia para uma melhor avaliação. A creatinina sérica não é marcadamente influenciada pela dieta ou por hemorragias intestinais, mas uma severa perda muscular poderá reduzir sua quantidade (BERGONSO, 2007).

Dentre os testes utilizados para esta avaliação hepática pode-se incluir as dosagens de alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO), fosfatase alcalina (FA) e proteínas totais (PT). A ALT/TGP é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente plasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática (SCHUMANN et al., 2002). A AST/TGO é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos, estando presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo (SCHUMANN et al., 2002).

A fosfatase alcalina é composta por um grupo de isoenzimas associadas à membrana, localizada em vários tecidos, mas somente dois são importantes para o diagnóstico, o tecido ósseo e hepatobiliar. Com exceção dos animais em crescimento ou pacientes com doença óssea, a atividade sérica elevada de fosfatase alcalina tem origem

hepatobiliar, principalmente devido à colestase e necrose por obstrução biliar intra-hepática (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

As proteínas totais são encontradas em todos os componentes das células, uma vez que são fundamentais na estrutura e funções celulares (RAVEL, 1995). Elas sofrem alterações de importância clínica, principalmente nos processos inflamatórios (bacterianos e imunológicos), parasitários e metabólicos (BASTOS, 2011; SILVEIRA, 1988).

A albumina faz parte da função hepática, porém também pode estar comprometida em casos de problemas renais crônicos; é uma proteína negativamente carregada, solúvel em água e sintetizada pelo fígado. A expressão de albumina é bloqueada em estados inflamatórios. A inflamação pode contribuir para a redução da concentração de albumina sérica através da supressão da síntese, aumento do catabolismo e permeabilidade vascular para a albumina, ou a combinação de todos esses fatores (BASTOS, 2011).

Na histologia, entre outros, pode ser observado infiltrado inflamatório, degeneração hidrópica, esteatose e necrose. Brasileiro Filho (2016) descreve muito bem todas estas alterações. Degeneração hidrópica é a lesão celular reversível caracterizada pelo acúmulo de água e eletrólitos no interior de células, tornando-as tumefeitas, aumentadas de volume; trata-se da lesão não letal mais comum diante dos mais variados tipos de agressão, independente da natureza do agente agressor, seja química, física ou biológica (BRASILEIRO FILHO, 2016).

Ainda segundo Brasileiro Filho (2016) a esteatose é o acúmulo de gorduras neutras (mono, di ou triglicerídeos) no citoplasma de células que normalmente não as armazenam. Quando ocorre é mais comum no fígado, epitélio tubular renal e no miocárdio, mas pode ser encontrada também em músculos esqueléticos e no pâncreas. Pode ser provocada por agressões muito diversas e a lesão aparece todas as vezes que um agente interfere no metabolismo de ácidos graxos da célula, aumentando sua captação ou síntese ou dificultando sua utilização, seu transporte ou excreção. Pode ser causada por agentes tóxicos, hipóxia, alterações na dieta e distúrbios metabólicos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O consumo de insetos é pouco preconizado na alimentação humana no Brasil, embora existam relatos de seu potencial como fonte de proteínas de alto valor nutritivo.

Uma das espécies com maior potencial de utilização é o *T. molitor*, especialmente sua farinha. Desta forma, estudos são necessários para avaliar se as larvas produzidas mantêm as propriedades nutricionais após seu processamento para produção de farinha e se as proteínas desta farinha apresentam digestibilidade adequada. Também, é necessário avaliar a segurança de se incorporar este suplemento na alimentação humana por meio de estudos bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. A resposta à estas questões são importantes para definição e proposição de políticas relacionadas ao consumo destes alimentos no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR-MIRANDA, E.D.; LÓPEZ, M.G.; ESCAMILLA-SANTANA, C.; BARBA DE LA ROSA, A. P. Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 192-195, 2002.

ANDERSEN S. O.; CHASE A. M.; WILLIS J. H. The amino-acid composition of cuticles from *Tenebrio molitor* with special reference to the action of juvenile hormone to the action of juvenile hormone. **Insect Biochemistry**, v. 3, p. 171-180, 1973.

BAEK, S.; PEREZ, A. E.; TURCOTTE R. M.; WHITE J. B.; AQAAdedip, F.; ADEDIPE, D.; PARK, Y.-L. Response of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults to potato: Implications for monitoring and sampling. **Journal of Stored Products Research**, v. 60, p. 5-10, 2015.

BASTOS, M. G. Biomarcadores de Função Renal na DRC. *In*: ABENSUR, H. (ed.). **E-book Biomarcadores na Nefrologia.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011, cap. 1. p. 7-18.

BERGONSO, T. H. D. **Valores bioquímicos referenciais de javali (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758), confinados em fazendas do estado de São Paulo.** 2007 14f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.

BELLUCO, S.; LOSASSO, C.; MAGGIOLETTI, M.; ALONZI, C.C.; PAOLETTI, M. G.; RICCI, A. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 296-313, 2013.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, 1542 p.

BURTIS C. A.; ASHWOOD E. R.; BRUNS, D. E. (ed.). **Tietz: Fundamentos de Química Clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 958 p.

CARRERA, M. Entomofagia humana. **Revista Brasileira de Entomologia,** v. 36, p. 889-894, 1992.

CERRITOS, R. Insects as food: an ecological, social and economical approach. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture. **Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, p.1-10, 2009.

COSTA-NETO, E.M. Insetos como fontes de alimentos para o homem: valoração de recursos considerados repugnantes. **Interciência,** v. 28, p. 136-140, 2003.

COSTA-NETO, E. M.; RAMOS-ELORDUY, J. Etnoentomologia de los insectos comestibles de Brasil: etnicidad, Diversidad e importancia en la alimentación. **Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa**, v.1, n. 38, p. 423–442, 2006.

DEFOLIART, G. R. Insects as food: why the western attitude is important. **Annu Revista Entomologia**, v. 44, p.21-50, 1999.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. Risk profile related to production and consumption of consumption of insects as food and feed. **EFSA journal**, v. 13, n.10, p. 1-60, 2015.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS /WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein and aminoacid requirements in human nutrition. World Health Organization Expert Consultation. **WHO Technical Report Series**, n. 935, 2007. Disponível em: http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO_TRS_935/en/ Acesso em 10/06/2018.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm´s Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Willians & Wilkins, 2000. 1232p.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.

FINKE, M. D. Estimate of chitin in raw whole insects. **Zoo Biology,** v. 26, p. 105-115, 2007.

FINKE, M.D. Complete nutrient content of four species of feeder insects. **Zoo Biology**, v. 32, p. 27-36, 2013.

FLORES, C.; SOBREVIA, L. Tumorogenesis and mdm2 protein. **Revista médica do Chile**, v. 128, n. 5, p. 539-546, 2000.

HAN, S.-R.; LEE, B.-S.; JUNG, K.-J.; YU, H.-J.; YUN,E.-Y. ; HWANG J. S.; MOON, K.-S. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v. 77, p. 206-212, 2016.

HAJEK, A.E.; MEYLING, N.V. Ecology of invertebrate pathogens: Fungi. *In*: HAJEK, A.E.; SHAPIRO-ILAN, D.I. (org.) **Ecology of Invertebrate Diseases**. Hoboken, New Jersey: John Wiley e Sons, 2018. p. 327-377.

ILLGNER, P., NEL, E. The geography of edible insects in Sub-Saharan Africa: a study of the mopane caterpillar. **Geography Journal**, v. 166, p. 336-351, 2000.

JACKSON, A.A. Limits of adaptation to high dietary protein intakes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p.44-52, 1999.

JACOBS, C.G.C.; GALLAGHER, J.D.; E.F. EVISON, S.E.F.; HECKEL, D.G.; VILCINSKAS, A.; VOGEL, H. Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). **Developmental and comparative Imunology**, v. 70, p. 1-8, 2016.

LEE, A.; JO, D.; CHO, J.H.; YUN, K.; YUN, E.; HWANG, J.; JUN, M.; KANG, B.H. Cytotoxic Effects of *Tenebrio molitor* Larval Extracts against Hepatocellular Carcinoma. **Journal Korean Society Food Science Nutrition**, v. 44, p. 200-207, 2015.

LI, L.; ZHAO, Z.; LIU, H. Feasibility of yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.*)* in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. **Acta Astronautica**, v.1, p. 1-7, 2012.

LI, L.; STASIAK, M; LI, L.; XIE B., FU, Y.; GIDZINSKI,D.; DIXON, M. , LIU H. Rearing *Tenebrio molitor* in BLSS: Dietary fiber affects larval growth, development, and respiration characteristics. **Acta Astronautica**, v. 118, p. 130-136, 2016.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v. 140, p. 21- 30, 2003.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature,** v. 403, p. 853-858, 2000.

MLCEK, J.; ROP, O; BORKOVCOVA, M.; BEDNAROVA, M. A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe: a review. **Polish Journal of Food Nutrition Sciences**, v.64, p. 147-157, 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for testing of chemicals**: Test Nº 407: Repeat dose 28 day oral toxicity study in rodents. p. 1-13, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1787/9789264070684-en. Acesso em: 21 mar. 2018.

OONINCX, D.G.A.B.; de BOER, I.J.M. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans: a life cycle assessment. **PLOS ONE**, v.7, p. 1-7, 2012.

RAMOS-ELORDUY, J. Insects: A hopeful food source. *In*: Ecological implications of minilivestock. **Science Public Enfield**, p. 263-291, 2005.

RAMOS-ELORDUY; J.; PINO, J.M.M. El consumo de insectos entre los Aztecas. *In*: LONG, J. (ed.) **Conquista y comida**: Consecuencias del encuentro de dos mundos. México: Universidad Nacional Autónoma de Mexico**,** p. 89-102, 1996.

RAUBENHEIMER, D.; ROTHMAN, J.M.; PONTZER, H.; SIMPSON, S.J. Macronutrient contribution of insects to the human diet: a geometric analysis. **Journal Human Evolution**, v. 71, p. 70-76, 2014.

RAVEL R. **Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data**. 6. ed. St Louis: Mosby, 1995, 615 p.

SCHUMANN G.; BONORA, R.; CERIOTTI F.; FÉRARD, G.; FERRERO, C. A.; FRANCK, P.F.; GELLA, J.F.; HOELZEL, W.; JØRGENSEN, P.J.; KANNO, T.; KESSNER, A.; KLAUKE, R.; KRISTIANSEN, N.; LESSINGER, J.M.; LINSINGER, T.P.J.; MISAKI, H.; PANTEGHINI, M.; PAUWELS, J.; SCHIELE, F.; SCHIMMEL, H.J.; WEIDEMANN, G.; SIEKMANN, L. Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 7, p. 725-33, 2002.

SILVEIRA, JM. **Patologia Clínica Veterinária: Teoria e Interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988, 196 p.

SIRIAMORNPUN, S.; THAMMAPAT, P. Insects as a delicacy and a nutritious food in Thailand. *In*: ROBERTSON, G.L.; LUPIEN, J.R. (ed.). **Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote National Development.** International Union of Food Science & Technology, Cap. 16, 2008.

SPANG, B. **Insects as food: assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*Tenebrio molitor*)**. 2013. 67f. Thesis (Environmental Study) - The Evergreen State College, Olympia, Washington, 2013.

STOKES, W. S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR Journal**, v. 43, p. 31-38, 2002.

SUPERIOR HEALTH COUNCIL. **Food safety aspects of insects intended for human consumption (SHC 9160)**. Scientific Committee of the Federal Agency for the safety of food chain, Bruxelas, 2014, p. 1-23.

TANG, Q.; DAI, Y.; LIU, X. Immunomodulatory effect of the larvae of yellow mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 8, p. 235-238, 2010.

TANG, Q.; DAI, Y.; ZHOU, B. Regulatory effects of *Tenebrio molitor Linnaeus* on immunological function in mice. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p.8348-8352, 2012.

TUNES, S. Insetos comestíveis. **Pesquisa FAPESP**, p. 60-67, 2020.

VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER, H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G.; VANTOMME, P. **Edible insects: Future prospects for food and feed security**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, 190p.

VELDKAMP, T.; VAN DUINKERKEN, G.; VAN HUiS, A.; LAKEMOND, C.M.M.; OTTEVANGER E.; BOSCH, G.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets - a feasibility study**. Wageningen: Wageningen UR Livestock Research, 2012. 49 p.

YANG,Y.; YANG, J.; WU, W.M.; ZHAO, J.; SONG, Y.; GAO, L.; YANG, R.; JIANG, L. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. **Environmental Sciense and Technology**, v. 49, p. 12080-12086, 2015.

YANG, Y.T.; LEE, M.R.; LEE, S.J.; KIM, S.; NAI, Y.S.; KIM, J.S. *Tenebrio molitor* Gram negative-binding protein 3 (TmGNBP3) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007. **Insect Science**, v. 25, p. 969-977, 2017.

YHOUNG-AREE, J.; PUWASTIEN, P.; ATTIG, G. A. Edible insects in Thailand: An unconventional protein source. **Ecology of Food and Nutrition**, v.36, p. 133-149, 1997.

YI, L.; LAKEMOND, C. M. M.; SAGIS, L. M. C.; EISNER-SCHADLER, V.; HUIS, A. V.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3341-3348, 2013.

YOO, J.; HWANG, J.S.; GOO, T.W.; YUN, E.Y. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 249-254, 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba pela oportunidadede de desenvolvimento deste trabalho.

Contribuições para a área de alimentos: experiências do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos campus Rio Pomba.

O E-book "Contribuições para a área de alimentos: experiência do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, campus Rio Pomba" engloba revisão de literatura e/ou resultados de várias pesquisas realizadas no Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste-MG, campus Rio Pomba. A equipe organizadora agradece a todos que fizeram parte da construção desta obra.

ISBN: 978-65-87185-11-8

Departamento Acadêmico DCTA Ciência e Tecnologia de Alimentos

INSTITUTO FEDERAL Sudeste de Minas Gerais | Campus Rio Pomba