

Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho

Incorporation of encapsulated Lactobacillus casei into type curd cheese

Janilton Rodrigues Lima¹, Gabriel Olivo Locatelli², Leandro Finkler³,
Christine Lamenha Luna-Finkler⁴

RESUMO

Introdução: O queijo tipo coalho é um alimento típico da região nordeste do Brasil, e apresenta características físico-químicas que permitem a veiculação de micro-organismos probióticos, mas poucos trabalhos tem explorado essa possibilidade.

Objetivo: Avaliar a capacidade de adesividade celular de *Lactobacillus casei* pelas características de hidrofobicidade e investigar a incorporação deste micro-organismo, na forma livre e encapsulada em alginato de cálcio, em queijo tipo coalho.

Materiais e Métodos: Inicialmente verificaram-se as características de adesividade celular de *Lactobacillus casei*, por meio de testes de polaridade com xilol (caráter apolar), clorofórmio (caráter ácido) e acetato de etila (caráter básico). Para crescimento celular do micro-organismo, foi elaborado um meio de cultura a base de soro de leite, sendo posteriormente microencapsulado em alginato de cálcio e seco a 35°C. As microcápsulas secas, assim como as células livres, foram incorporadas durante a elaboração do queijo tipo coalho.

Resultados: Foi possível atingir uma alta concentração celular no meio à base de soro de leite (10^8 UFC/mL), diminuindo uma unidade logarítmica durante a microencapsulação e secagem. Os queijos apresentaram contagem de bactérias lácticas após 10 dias de maturação de $1,4 \times 10^8$ UFC/g para o queijo com *Lactobacillus casei* livre e $9,1 \times 10^7$ UFC/g para o queijo com *Lactobacillus casei* microencapsulado.

Conclusão: Desta forma, os queijos obtidos com a introdução de ambas as formas de *Lactobacillus casei* apresentaram concentrações de células viáveis consideradas adequadas para alimentos probióticos, podendo concluir que o queijo tipo coalho é um produto com características interessantes para a veiculação de micro-organismos probióticos.

Palavras-chave: alginato; microencapsulação; probiótico; queijo coalho; soro de leite.

ABSTRACT

Introduction: The cheese type curd is a typical food of the northeastern region of Brazil, and its physical-chemical characteristics allows the incorporation of probiotic microorganisms, although few studies have explored this possibility.

Objective: This work aims to evaluate the cell adhesiveness of *Lactobacillus casei* by its hydrophobicity characteristic and to investigate the incorporation of this micro-organism in both free form and encapsulated in calcium alginate in the curd cheese type.

Materials and Methods: Initially we investigated the characteristics of cell adhesion of *Lactobacillus casei*, by testing polarity using xylol (nonpolar), chloroform (acid) and ethyl acetate (basic). For cell growth of the micro-organism it was prepared a culture medium based on whey, which was microencapsulated in calcium alginate and dry to 35°C. The dried microcapsules, as well the free *Lactobacillus casei* cells, were incorporated during the preparation of the cheese.

Results: According to the results, it was possible to achieve a high cell concentration in the culture medium based on whey (10^8 UFC/mL), decreasing one logarithmic cycle during the drying and microencapsulation. The cheeses had counts of lactic acid bacteria after 10 days of maturation of $1,4 \times 10^8$ UFC/g (cheese with free *Lactobacillus casei*) and $9,1 \times 10^7$ UFC/g (cheese with microencapsulate *Lactobacillus casei*).

Conclusions: Thus, cheeses made with the introduction of both forms of *Lactobacillus casei* showed viable cell concentrations considered adequate for food probiotics. It can be concluded that the cheese type curd is a product with characteristics of interest for the incorporation of probiotic microorganisms.

Keywords: alginate; microencapsulation; probiotic; cheese type curd; whey.

¹Nutricionista graduado pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Bacharel em Biotecnologia Industrial. Mestre em Biotecnologia Industrial e Doutorando em Biotecnologia (UFPE).

³Engenheiro de Alimentos. Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Docente do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE).

⁴Engenheira Química. Doutora em Engenharia Química pela UFRJ. Docente do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE).

INTRODUÇÃO

O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde e bem estar, vêm despertando cada vez mais o interesse do público consumidor. Em contrapartida, a comunidade científica busca comprovar a atuação desses alimentos na promoção de saúde e prevenção de doenças. Recentemente inúmeras pesquisas nesta área têm dado subsídios para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios com a alegação de propriedades funcionais. Dentre os alimentos que se enquadram nesta categoria, os probióticos se destacam pelas suas vantagens e aplicações, estando principalmente disponíveis em produtos lácteos.

Segundo a FAO/WHO¹ os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas afetam positivamente a saúde do hospedeiro. Devem ser inócuos, não patogênicos, manter-se viáveis após processamento tecnológico, ter vida de prateleira longa, apresentar resistência ao pH baixo do suco gástrico e à ação das secreções pancreáticas e biliares, além de terem a capacidade de colonizar o cólon^{1,2}. A adesão dos probióticos a mucosa intestinal depende da hidrofobicidade e da composição da parede celular, da existência de receptores e ligantes como as adesinas e de elementos de fixação que impedem sua eliminação pelo peristaltismo intestinal, impedindo sua excreção pelas fezes³. Devido a essas características os probióticos colonizam a mucosa intestinal, diminuindo o pH e dificultando a proliferação de bactérias patogênicas, alguns trabalhos mostram que esse efeito de acidificação favorece a absorção de minerais como o cálcio e o ferro, fortalecendo a composição óssea^{2,4}.

Apesar da grande diversidade de micro-organismos probióticos, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais comumente adotados pela indústria laticinista⁵⁻⁷. Em queijos destaca-se a adição de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, havendo poucos estudos científicos que relatam a incorporação de *Lactobacillus* a este tipo de alimento. O grupo *Lactobacillus casei* tem grande valor comercial devido à vasta diversidade de alimentos que podem ser introduzidos, conferindo aroma, sabor, textura e ainda auxiliando na bioconservação dos alimentos pelo processo de acidificação⁴.

Os queijos frescos possuem pH, conteúdo lipídico e atividade de água adequados para adição de probióticos, além de matriz sólida, a qual pode proteger os probióticos com maior eficiência durante a elaboração, estocagem e também, durante o trânsito no organismo humano^{8,9}. Dentre os queijos frescos o queijo coalho é um dos mais tradicionais e difundidos na região Nordeste do Brasil, fabricado principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba¹⁰. Legalmente, é obtido por coagulação do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes, complementada ou não por ação de bactérias lácticas selecionadas. É classificado como queijo de massa semi-cozida ou cozida, de média a alta umidade e com teor de gordura nos sólidos totais entre 35 e 60%¹¹.

O queijo coalho geralmente é produzido artesanalmente, em unidades de produção caseira ou em pequenas propriedades rurais^{12,13}. Em geral é elaborado a partir de leite cru, sendo muitas vezes o leite obtido sob condições de ordenha deficientes em higiene, o que leva à contaminação do produto final. Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo coalho relataram a ocorrência de micro-organismos patogênicos e deterioradores em números que excedem aos limites estabelecidos pela legislação. Dentre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*¹³⁻¹⁷. Desta forma, a veiculação de micro-organismos probióticos a este tipo de alimento, pode ser uma alternativa para a redução desses contaminantes.

Fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem e compostos antimicrobianos presentes no leite, podem reduzir a viabilidade dos probióticos durante o período de armazenamento⁷, outro fator é a sensibilidade às condições gástricas do estômago que reduz a viabilidade desses micro-organismos antes de atingirem o cólon intestinal. Para minimizar esses problemas, algumas técnicas podem ser empregadas, como a utilização de métodos de microencapsulação^{18,19}.

A microencapsulação emprega polímeros naturais, que por diferentes técnicas de aprisionamento,

envolvem os micro-organismos permitindo o aumento da resistência das células à ação de fatores ambientais. Há diversos tipos de polímeros empregados para microencapsulação, entretanto na indústria de alimentos um dos mais utilizados é o biopolímero alginato de sódio, que em presença de cálcio e outros íons divalentes pode trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, gelificando o meio em que se encontra, as microcapsulas formadas resistem as condições ácidas do estomago, sendo dissolvidas ao chegarem ao colón intestinal¹⁸⁻²⁰.

Desta forma, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade de adesividade celular de *Lactobacillus casei*, pelas características de hidrofobicidade e, investigar a incorporação deste micro-organismo, na forma livre e encapsulada em alginato de cálcio, em queijo tipo coalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

A cepa de *Lactobacillus casei* foi obtida da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE e mantida em tubos contendo meio MRS Ágar (adicionado de 2,0% p/v de glicose), sendo armazenada em geladeira (4°C a 8°C) e submetida a repiques periódicos.

Ensaio de adesividade de Lactobacillus casei

Os ensaios de adesividade foram realizados em triplicata, de acordo com a metodologia descrita por Barbosa²⁰. A partir de uma cultura mantida em MRS Agar, foi preparada uma suspensão de *Lactobacillus casei* em 35mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) com turbidez equivalente a 2,0 na escala Mcfarland. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4000rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas por duas vezes com a adição de 35mL do tampão fosfato. Por fim, o centrifugado foi ressuspenso em 50mL de KNO₃.

Em diferentes tubos de ensaio foram adicionados 1mL dos solventes xilol (caráter apolar), clorofórmio (caráter ácido) e acetato de etila (caráter básico) e 4mL de suspensão celular. Após a mistura célula-solvente, as

amostras ficaram em repouso por 5 minutos, seguidas de agitação em vórtex por 2 minutos. Após repouso de 60 minutos foram realizadas leituras de absorbância da fase aquosa a 600nm em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata.

O percentual de adesão foi determinado de acordo com a Equação 1:

$$\% \text{ adesão da parede celular} = \frac{(DOA - DOB) \times 100}{DOA}$$

Onde, DOA é a densidade óptica da amostra (branco – 5mL de solução de KNO₃, amostra – 5mL de solução de KNO₃ + células) e DOB é a densidade óptica do branco (branco – 4mL de solução de KNO₃ + 1mL dos solventes, amostra – 4mL de suspensão celular em solução de KNO₃ + 1mL dos solventes).

Condições de cultivo

Foi preparado um pré-inóculo em solução salina estéril, com turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland, a partir da cultura fresca crescida em MRS Agar. Um volume de 5mL do pré-inóculo foi transferido para um frasco Erlenmeyer (250mL de capacidade), contendo 45mL de meio caldo MRS adicionado de 2% de glicose (p/v), representando uma concentração de pré-inóculo de 10% (v/v). As células foram incubadas sob condição estacionária a 37°C por 12 horas, para a obtenção do inóculo.

O crescimento celular foi realizado em meio de cultura formulado à base de soro de leite, que apresentou a seguinte composição em g/L: MnSO₄.H₂O (0,05); MgSO₄.7H₂O (0,10); citrato de sódio (2,00); acetato de sódio (5,00); K₂HPO₄ (2,00); glicose (40,00); tween 80 (1,00); extrato de levedura (25,00); soro de leite (qsp 1,0L de meio). O soro foi gentilmente cedido pela empresa Natural da Vaca®, localizada em Gravatá - PE.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers (500mL de capacidade), contendo 200mL de meio. Foi empregada uma concentração de inóculo de 5% (v/v) e os frascos foram incubados sob condição estacionária à 37°C por 48 horas.

Visando à obtenção de um concentrado de células para os ensaios de encapsulação, o caldo fermentado foi centrifugado, sob refrigeração, a 10°C (Hermle®, modelo Z36HK) a 4000rpm por 15 minutos. Amostras do

final do cultivo e da suspensão celular concentrada foram retiradas para determinação da concentração de células viáveis, expressa em UFC/mL.

Microencapsulação de Lactobacillus casei

As microcápsulas foram preparadas a partir de uma solução de alginato de sódio (Danisco®) a uma concentração de 1% (p/v) em água destilada estéril, solubilizado em banho-maria a 50°C sob agitação constante.

A suspensão celular concentrada foi misturada à solução de alginato na proporção de 1:4 (v/v), formando uma suspensão (célula/alginato) que foi gotejada com uma seringa de 20mL em um volume de 100mL de uma solução de CaCl₂ (0,1M) sob leve agitação. As microcápsulas formadas foram mantidas sob refrigeração a 8°C por 2 horas, sendo posteriormente lavadas duas vezes com solução salina estéril 0,85% (p/v). Após pesagem das partículas úmidas, estas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 35°C até peso constante.

O armazenamento das microcápsulas após a secagem foi realizado em um frasco hermeticamente fechado mantido em geladeira (2°C à 8°C). Amostras da suspensão células/alginato e das partículas secas foram retiradas para determinação da concentração de células viáveis.

Preparo do queijo de coalho com Lactobacillus casei livres e microencapsulados

Para o preparo do queijo de coalho foi utilizado leite pasteurizado e padronizado, adquirido em supermercado na cidade de Vitória de Santo Antão – PE. As embalagens foram higienizadas antes de serem abertas e manipuladas de acordo com as normas de boas práticas de fabricação. Com o objetivo de avaliar suas características microbiológicas, o produto foi submetido à contagem de bactérias totais em meio PCA, contagem de células em meio MRS Agar (seletivo para bactérias lácticas) e plaqueamento em EMB, recomendado para o isolamento e diferenciação de bactérias entéricas Gram-negativas.

O processo de fabricação do queijo coalho foi baseado nos trabalhos de Cavalcante et al.¹⁶ e Laguna

e Egito²¹, com algumas modificações para a adição dos micro-organismos. O leite foi aquecido à 65°C e mantido por 30 minutos para pasteurização, em seguida resfriado a 37°C; adição lenta de CaCl₂ (0,05% p/v, previamente diluído em 10mL de água destilada); adição lenta do coalho (0,0625g/L, previamente diluído em 10mL de água destilada); repouso por 50 minutos; corte da coalhada com o auxílio de liras horizontais e verticais; mexedura da coalhada; realização da dessoragem; salga da massa (concentração de sal de 0,4% p/v); enformagem; prensagem manual; desenformagem; maturação e pesagem.

A massa total obtida foi dividida em 2 porções, uma para a adição do *Lactobacillus casei* livre e a outra para a adição do *Lactobacillus casei* microencapsulado. A adição dos micro-organismos probióticos foi realizada na etapa de enformagem, adicionando-se 0,01% (p/p) de microcápsulas ou 0,01% (v/p) de suspensão celular concentrada (diluída em 1,0mL de soro de leite) para 200g de massa. A prensagem foi realizada por um período de 14 horas a temperatura ambiente; em seguida, os queijos foram retirados das formas, pesados novamente, embalados em um tecido estéril e colocados em refrigerador a 10°C para maturação por 7 dias. Após este período, foram retiradas amostras para contagem das células probióticas e caracterização físico-química.

Métodos analíticos

Contagem de Células Viáveis: todas as amostras foram submetidas às diluições decimais seriadas em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85% p/v). Em seguida, um volume de 100µL de diferentes diluições foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar (suplementado com 2% de glicose p/v) pela técnica de “pour plate”. As placas foram incubadas em estufa por 72 horas a 37°C e após a contagem, as colônias foram expressas em UFC/mL ou UFC/g. Para a contagem nos queijos, amostras de 25g foram diluídas em Erlenmeyers, de 500mL de capacidade, contendo 225mL de água peptonada estéril (0,1% p/v)²², enquanto que para a contagem nas microcápsulas, a primeira diluição foi realizada em solução de citrato de sódio (2% p/v) para a completa dissolução das

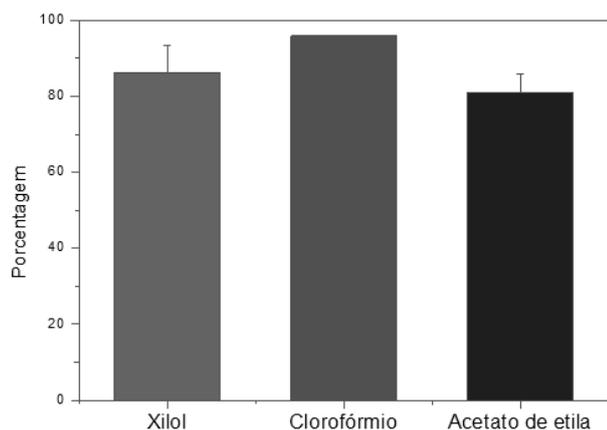


FIGURA 1 – Porcentagem de hidrofobicidade e características ácido-básicas da parede celular de *Lactobacillus casei*.

microcápsulas. Em ambos os casos, foi realizado o mesmo procedimento de diluições seriadas e incubação, descrito acima.

Caracterização Físico-química dos Queijos: foi realizada de acordo com as metodologias analíticas oficiais para as análises de cinzas, gordura, umidade, nitrogênio total e pH²³.

RESULTADOS

Os resultados de hidrofobicidade e das características ácido básicas podem ser observados na figura 1. O solvente xilol possui caráter apolar, e quanto maior a solubilidade das células nesse solvente, maior o grau de hidrofobicidade. Desta forma, as células de *Lactobacillus casei* apresentaram um elevado grau de hidrofobicidade, atingindo $86,3 \pm 7,2\%$. Já o solvente clorofórmio apresenta um caráter ácido, enquanto o acetato de etila apresenta um caráter básico. As células de *Lactobacillus casei* foram mais solúveis em clorofórmio ($95,9 \pm 3,0\%$) do que em acetato de etila ($81,0 \pm 5,0\%$), indicando uma superfície celular mais ácida.

O preparo do inóculo em caldo MRS (suplementado com 2% de glicose p/v) foi acompanhado durante 12 horas de cultivo, apresentando uma fase exponencial de crescimento entre 9 e 11 horas, com velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) de $0,40h^{-1}$. Desta forma, foi definido em 10 horas o tempo favorável para a transferência do inóculo para o meio de cultivo.

O cultivo no meio à base de soro de leite cresceu

TABELA 1 – Concentração de células viáveis de *Lactobacillus casei* durante o processo de microencapsulação.

Amostra	Concentração de células viáveis
Caldo fermentado	$6,90 \times 10^8$ UFC/mL
Suspensão celular concentrada	$1,65 \times 10^{10}$ UFC/mL
Suspensão células/alginato	$4,15 \times 10^9$ UFC/mL
Microcápsulas secas	$7,40 \times 10^7$ UFC/g

exponencialmente entre 5 e 48 horas, sendo obtida uma concentração final de células viáveis $6,9 \times 10^8$ UFC/mL, adequada para o uso do caldo fermentado como inoculante em alimentos com características probióticas. O caldo fermentado foi concentrado por centrifugação e a suspensão celular concentrada foi utilizada na inoculação do queijo de coalho e no preparo das microcápsulas contendo *Lactobacillus casei*.

Nos ensaios de microencapsulação foi possível obter, a partir de 20mL de suspensão célula/alginato, uma massa de 7,3g de microcápsulas úmidas, um rendimento de 36,5%. Essas partículas foram submetidas à secagem a 35°C em estufa de circulação de ar, até apresentarem peso constante, que foi atingido com 3 horas de secagem. O aspecto das microcápsulas úmidas e secas pode ser observado na figura 2.

Os resultados de concentração de células viáveis nas amostras do caldo fermentado, suspensão celular concentrada, suspensão de células/alginato e nas microcápsulas secas estão apresentados na tabela 1.

O leite empregado na fabricação dos queijos apresentou contagem de bactérias totais e lácticas de $2,2 \times 10^3$ UFC/mL e $4,0 \times 10^2$ UFC/mL respectivamente, não sendo observado crescimento de micro-organismos no meio EMB. Os queijos apresentaram um rendimento final da massa úmida de aproximadamente 10% da massa inicial de leite, o que está de acordo com o rendimento esperado para esse tipo de queijo.

TABELA 2 – Composição centesimal dos queijos realizada após 10 dias de preparo.

Componente (%)	Queijo suplementado com células livres	Queijo suplementado com células encapsuladas
Proteínas	25,3	26,0
Carboidratos	5,0	12,3
Lipídios	38,0	38,0
Umidade	28,9	20,7
Cinzas	2,8	3,0

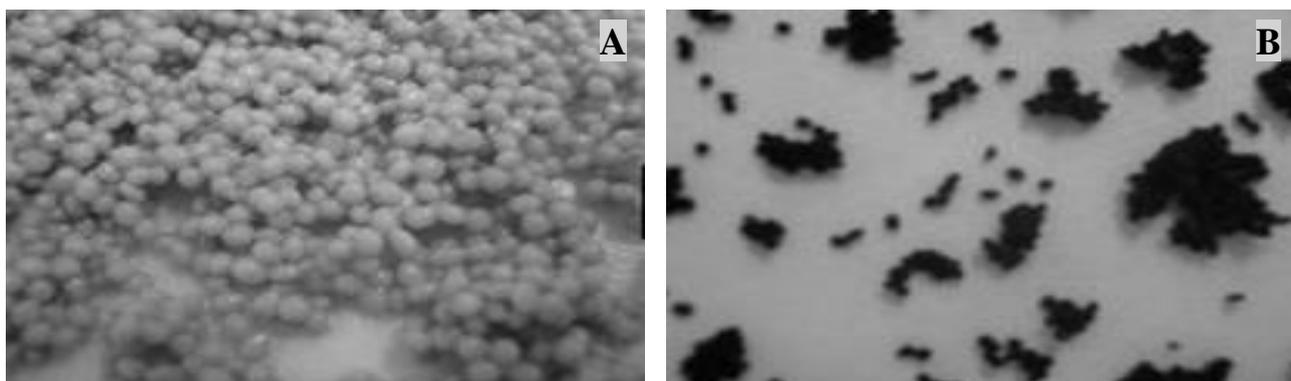


FIGURA 2 – Microcápsulas de *Lactobacillus casei* úmidas (A) e secas (B).

A contagem de bactérias lácticas após 10 dias de maturação foi de $1,4 \times 10^8$ UFC/g para o queijo com *Lactobacillus casei* livre e $9,1 \times 10^7$ UFC/g para o queijo com *Lactobacillus casei* microencapsulado. Os resultados relativos à composição centesimal dos queijos estão apresentados na tabela 2.

DISCUSSÃO

Segundo Pelletier²⁴ estudos físico-químicos de superfícies celulares microbianas têm demonstrado relações entre cargas superficiais, hidrofobicidade e a composição elementar da superfície celular. Como compostos mediadores de adesão destacam-se as adesinas, que possuem caráter hidrofóbico, mas a adesão pode ainda ser mediada por outros fatores associados à superfície bacteriana, como os ácidos lipoteicóicos e exopolissacarídeos presentes nas células dos micro-organismos^{25,26}. Nas condições investigadas, a cepa de *Lactobacillus casei* utilizado apresentou características de hidrofobicidade e de superfície celular com caráter ácido que indicam um bom potencial de adesão ao epitélio intestinal, confirmando seu potencial probiótico.

Silveira²⁷ realizou fermentações de *Lactobacillus casei* em um meio sintético (pH 6,5 e 37°C), com a finalidade de obtenção de ácido láctico e observaram uma maior taxa específica de crescimento celular ($0,61 \text{h}^{-1}$). No entanto, este estudo foi realizado com um meio de cultura contendo 50g/L de açúcares redutores, superior à quantidade utilizada no presente trabalho, que foi de 20g/L de glicose.

Segundo a ANVISA, a quantidade mínima de micro-organismos probióticos viáveis deve estar situada na

faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante²⁸. Como podemos observar, o caldo fermentado já apresenta uma concentração celular satisfatória para ser considerado um produto probiótico. Com a centrifugação essa concentração aumenta em 2 ciclos logarítmicos atingindo $1,65 \times 10^{10}$ UFC/mL.

As microcápsulas secas apresentam uma diminuição no número de células viáveis devido ao processo de secagem. Esta etapa é necessária para a obtenção de um produto estável e de fácil manipulação, podendo a amostra ser armazenada e transportada com maior facilidade. De acordo com Terra et al.²⁹, as microcápsulas úmidas podem ser alvo fácil de contaminação, sendo necessária a rápida secagem logo após o processo de microencapsulação. Nas microcápsulas os micro-organismos encontram-se envolvidos por uma camada de alginato, o que confere uma proteção adicional e permite um aumento da resistência das células à ação dos fluidos biológicos gerados no processo de digestão^{18,19,29}.

Como estabelecido pela ANVISA, valores menores que 10^8 e 10^9 UFC podem ser aceitos, desde que comprovada sua eficácia. Há trabalhos que propõem que a dose mínima diária de culturas probióticas considerada terapêutica corresponda ao consumo de 100g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g^{4,28,30,31}. Desta forma, as microcápsulas secas podem ser uma alternativa interessante para a inoculação de micro-organismos probióticos em alimentos.

Como indicado pela análise do leite utilizado na fabricação dos queijos, este apresentou uma contagem inicial de bactérias lácticas, de acordo com padrões

estabelecidos pela legislação³². O leite contém naturalmente bactérias lácticas e algumas espécies como *Streptococcus thermophilus*, podem sobreviver ao processo de pasteurização³³. Outras espécies de bactérias lácticas podem também contaminar o leite após este processo.

O queijo com *Lactobacillus casei* microencapsulado apresentou uma contagem de bactérias lácticas abaixo do queijo com *Lactobacillus casei* livres, onde obtivemos o maior número de células viáveis, fato também verificado por Godward e Kailasapathy³⁴. Isso pode ocorrer pelo fato do micro-organismo microencapsulado não ter a mesma mobilidade de colonizar os queijos como os micro-organismos livres. Ainda segundo os autores, a matriz do alimento, que é muito complexa, pode impedir a troca de nutrientes e metabólitos entre as microcápsulas e o ambiente externo³⁴. Por outro lado, as células microencapsuladas tem uma maior resistência à ação dos fluidos biológicos, podendo chegar com maior viabilidade ao cólon intestinal^{20,35}. Esse aumento da resistência às condições ácidas do estômago foi comprovado por Oliveira³⁵, onde nos tratamentos em pH 1 e 3 por 3 horas, as células de *L. acidophilus* encapsuladas com pectina e caseína não diminuíram sua viabilidade celular, enquanto células livres reduziram em até 3 ciclos logarítmicos sua população microbiana.

A suspensão celular concentrada obtida pela fermentação em meio à base de soro de leite pode ser uma alternativa viável para a inoculação de *Lactobacillus casei* em queijo coalho produzido pelos pequenos laticínios produtores. O produto obtido pode ser considerado um alimento probiótico, visto que a contagem de células viáveis apresenta-se de acordo com a legislação específica²⁸. No entanto, o queijo coalho com *Lactobacillus casei* microencapsulado por alginato de cálcio, também pode ser uma alternativa tecnológica interessante, pois pode garantir uma maior viabilidade das células ao chegarem ao cólon intestinal.

De acordo com o MAPA pela Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001, que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade do queijo de coalho¹¹, o queijo de coalho é um queijo de média a alta umidade, sendo considerados queijos de média

umidade os que apresentam entre 36,0 e 45,9% de água e queijos de alta umidade os que apresentam entre 46,0 e 54,9% de água. O baixo teor de umidade observado nos queijos obtidos neste estudo pode ser explicado pelo fato de que a análise físico-química foi realizada após 10 dias de sua fabricação, havendo uma perda de umidade neste período. Os demais resultados físico-químicos se encontram de acordo com a legislação¹¹ e com os resultados observados por Machado¹⁰. Essas características fazem do queijo coalho um produto interessante para a veiculação de micro-organismos probióticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Natural da Vaca®, por ter cedido o soro de leite. Ao apoio financeiro dos órgãos de fomento, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba: FAO; 2001. 34p.
2. Lavanda I, Saad SMI, Lobo AR, Colli C. Prebióticos y su efecto em la biodisponibilidad del calcio. Rev Nutr. 2011; 24(2):333-44.
3. Barbosa FH, Silva AM, Martins FS, Nicolli JR. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. Rev Biol Ciênc Terra. 2005; 5(2):1-11.
4. Burity FCA, Saad SMI. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Arch Lat Nutr. 2007;57(4):373-80.
5. Haully MCO, Fuchs RHB, Prudencio-Ferreira SH. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. Rev Nutr. 2005;18(5):613-22.
6. Alves LL, Mattanna P, Becker LV, Richards NSPS, Andrade DF. Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. Alim Nutr. 2008;19(4):409-16.
7. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol Cell Biol. 2000;78:80-8.
8. Kasimoglu A, Goncuoglu M, Akgun S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. Int Dairy J. 2004; 14:1067-73.
9. Bergamini CV, Hynes ER, Quiberoni A, Zalazar CAI. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the

- addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Res. Int.* 2004; 38(5):597-604.
10. Machado GM, Costa EGB, Costa Junior LCG, Sobral D, Taveira LB, Souza BM. Aspectos físico-químicos de queijo de coalho fabricado com o uso de ácido láctico. *Alim Nutr.* 2011; 22(3):421-8.
 11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inst. Normativa N° 30, de 26 de junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, 2001. Brasília (DF): Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2001.
 12. Leite CC, Guimarães AG, Ribeiro NS, Silva MD, Assis PN. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo "Coalho" comercializado em Salvador (BA). Importância para a saúde pública. *Rev Analyt.* 2002; 2:38-41.
 13. Meneses RB, Cardoso RCV, Guimarães AG, Góes JAW, Silva AS, Argolo SV. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. *Rev Nutr.* 2011; 25(3):381-92.
 14. Feitosa T, Borges MF, Nassu RT, Azevedo ÉHF, Muniz CR. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2003; 23:162-5.
 15. Oliveira OMAB, Bastos MSR, Fontenele MA, Oliveira CW, Silva APV. Adequação da produção de leite para queijo coalho, conforme a Instrução Normativa No 51. *Rev Hig. Alim.* 2010; 24(182):97-102.
 16. Cavalcante JFM, Andrade NJ, Furtado MM, Ferreira CLLF, Pinto CLO, Elard E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2007; 27(1):205-14.
 17. Santana RF, Santos DM, Martinez ACC, Lima ÁS. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008; 60(6):1517-22.
 18. Souza FN, Gebara C, Ribeiro MCE, Chaves KS, Gigante ML, Grosso CRF. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Res Int.* 2012; 49:560-6.
 19. Pawar KS, Pawar SP, Patel VA. Microbial polysaccharidases in colon specific drug delivery. *Int J Pharm Scienc Rev Res* 2011; 6(2):188-96.
 20. Favaro-Trindade CS, Pinho SC, Rocha GA. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz J Food Technol.* 2008;11(2):103-12.
 21. Laguna LE, Egito AS. Processamento do queijo de coalho fabricado com leite de cabra maturado e defumado. Sobral (CE): Embrapa; 2008. Comunicado técnico 90, Prática e processo agropecuário.
 22. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela; 2010.
 23. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – métodos físicos e químicos. Brasília (DF): Laboratório Nacional de Referência Animal; 1981.
 24. Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(5):1725-31.
 25. Vélez MP, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 276:140-8.
 26. Meira SMM. Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha [dissertação]. Porto Alegre (RS): UNIJUÍ/UEGRS; 2011. 107p.
 27. Silveira MS. Utilização do suco de caju clarificado para a produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442 [dissertação]. Fortaleza (CE): UFC; 2009. 97p.
 28. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX - lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
 29. Terra NM, Lopes VS, Coutinho-Filho U, Cardoso VL. Produção de probióticos de células imobilizadas de *Lactobacillus* por fermentação em soro de leite. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, 2009; 1-5.
 30. Cichoski AJ, Cunico C, Di Luccio M, Zitkoski JL, Carvalho RT. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008; 28(1):214-9.
 31. Komatsu RT, Burity FCA, Saad SMI. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2008; 44(3):329-47.
 32. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inst. Normativa No51, de 18 de setembro de 2002. Brasília (DF): Diário Oficial da União. 20 de setembro de 2002.
 33. Bruno LM, Carvalho JDG. Microbiota láctica de queijos artesanais. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2009. Documentos 124. 29p.
 34. Godward G, Kailasapathy K. Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese. *Milchwissenschaft.* 2003; 58:624-7.
 35. Oliveira AC. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Endereço para correspondência:

Gabriel Olivo Locatelli
 Rua do Alto do Reservatório s/n°
 Vitória de Santo Antão/PE - CEP 55608-680
 Telefone: +55 81 97941434
 Email: gabriel_locatelli@hotmail.com