UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**Influência da associação de culturas probióticas sobre as
características de queijo *petit-suisse***

Lucas Campana Pereira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2007

Lucas Campana Pereira

Influência da associação de culturas probióticas sobre as
características de queijo *petit-suisse*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, agosto de 2007.

**“Combater-se a si mesmo é a mais difícil guerra,
Vencer-se a si mesmo é a mais bela vitória”.**

A meus pais e irmãos pela oportunidade e confiança.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me dado uma família perfeita, muita saúde e apoio para chegar nessa fase que nunca pensei que poderia chegar.

Todas as dissertações que leio os autores separam em parágrafos para falar dos pais, mais acho que não consigo fazer isso. Muito obrigado pai e mãe pelo apoio e exemplo que vocês sempre me deram e dão até hoje. Vocês são dois lutadores e exemplos de caráter e honestidade. É difícil tentar explicar a importância de vocês na minha vida, todo dia agradeço a Deus por ser filho de vocês, e compartilhar tanta coisa juntos. Espero ser uma cópia de vocês, porque na minha vida eu não me espelho em mais ninguém a não ser em vocês. Amo cada momento ao lado de vocês, amo ouvir suas vozes no telefone para aliviar minha saudade, amo quando começam a contar suas experiências e suas lutas. Amo você Geraldão pela história sofrida da sua vida, pela luta diária em conquistar algo melhor para seus filhos, amo você Vera pela doçura com que cria seus filhos e como nos defendem de tudo e de todos, amo vocês demais hoje e sempre. Obrigado pela chance que vocês me deram e eu sei que sempre vão continuar oferecendo sempre o melhor para mim, para o Ro e o Ju.

Também não vou separar para falar dos meus grandes irmãos, é incrível como realmente eu tenho sorte por ter vocês do meu lado. Ro e Ju vocês são outros dois exemplos de vida para mim, de buscar as coisas em que acreditam e de que gostam. Ro sempre você foi o primeiro a lutar pelos ideais, começando da sua conquistas nos esporte e também da passagem fantástica no vestibular, e agora da sua responsabilidade de comandar uma clínica sozinho e nunca perder o humor, para tornar mais leve nossos dias. Ju o chorão dos irmãos, desculpa falar isso mais é verdade né. Era incrível sua doação também no esporte, nunca tinha bola perdida, eu adorava ver os jogos de você e do Ro, porque sempre quis fazer metade do que vocês faziam em quadra e acho que não consegui, mais sua dedicação em tudo que você faz sempre me impressionou e impressiona até hoje. Amo vocês demais, obrigado pelo apoio e pelos exemplos de vocês dois. E também obrigado pela ajuda e torcida das minhas cunhadas preferidas Fá e Sá.

A minha orientadora Profa. Dra. Susana Saad inicialmente pela grande paciência, pelos ensinamentos diários, pela confiança e pelo todo apoio que

me deu durante esses anos de aprendizado, muito obrigado por tudo.

A grandes amigos que realmente sem eles não conseguiria chegar nesse nível, André e Cinthia. Acho que vocês imaginam a importância de vocês em minha vida, André obrigado por toda a ajuda desde quando eu cheguei aqui em São Paulo, pelas dicas, pelas conversas, ou seja, pela grande amizade. Cinthia minha co-orientadora, tenho certeza que sem você não conquistaria metade do que alcancei aqui, obrigado pela paciência de me explicar quase tudo, de tornar meus dias mais engraçados e pelas grandes conversas e segredos, muito obrigado.

Ao grande casal Bi e Cibele por terem me adotado durante 6 meses quando eu cheguei em São Paulo, foram irmãos para mim, pelas explicações e pelos ensinamentos de como viver em São Paulo e pelas oportunidades que me deram durante tanto tempo, obrigado por tudo.

A minha linda Aninha por ter me agüentado até hoje, por ter tido tanta paciência comigo, por ter agüentando meus desesperos, minhas desconfianças em minha capacidade, minhas ligações noturnas, e também a grande distância que nos separa. Adoro-te muito japa do meu coração.

Aos meus grandes amigos que é difícil citar nomes, já que tenho muita sorte de ter muitos amigos fiéis, que sempre me apoiaram em todas as horas, seja nos momentos de felicidades como em bares e churrascos da vida, ou momentos duros que graças a Deus eu tive poucos. Sem vocês não teria chegado até aqui com certeza.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio por ser um exemplo de pessoa e pesquisador, à Profa. Dra. Carlota por ser tão inteligente, humilde e simpática e ao Prof. Dr. Jorge pela ajuda em todo esse caminho percorrido.

Ao Jorge e Elaine pela simpatia e pela amizade durante todo esse tempo, vocês são muito importantes em minha vida.

Aos colegas de trabalho Virgilio, Roberta, Haíssa, Flavia, Juliana, Larissa, Keilinha, Chiu, Denise, Jabuti e Camila pelo companheirismo diário.

Aos funcionários Ivani (por cuidar tão bem de mim), Alexandre, Nilton, Elza,

Miriam, Glédson, Juarez e Fátima por toda a ajuda e amizade em todo esse tempo.

A CAPES pelo auxílio financeiro e bolsa.

Às empresas Salute, Danisco, Rhodia, Mylner, Plury Química e Christian Hansen, pelo fornecimento de parte dos recursos materiais empregados nesta pesquisa.

RESUMO

A possibilidade de se obter um produto com grande aceitabilidade nacional, principalmente voltado ao público infantil, com propriedades microbiológicas, nutricionais, físico-químicas e organolépticas ótimas associadas aos benefícios creditados aos probióticos é bastante promissora. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do emprego de culturas probióticas compostas pelos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04 isolados e em co-cultura, em queijo tipo *petit-suisse* processado com a adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura *starter*, sobre as características do produto, ao longo do seu armazenamento refrigerado.

Quatro tratamentos de queijo *petit-suisse* foram estudados (em triplicata): T1 (controle - *Streptococcus thermophilus* ST), T2 (ST + *Lactobacillus acidophilus* La-5), T3 (ST + *B. animalis* subsp. *lactis* BL04) e T4 (ST + La-5 + BL04) e armazenados a $4\pm1^{\circ}\text{C}$. Foram avaliados parâmetros microbiológicos (população de probióticos, *starter* e contaminantes), de textura, físico-químicos e sensoriais (aceitabilidade). As análises sensoriais foram realizadas após 7 e 14 dias e as demais análises, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento dos produtos a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

As populações dos probióticos estiveram sempre superiores ao mínimo recomendado para um alimento probiótico, tendo variado de 7,22 a 7,60 log UFC/g e de 8,56 a 8,72 log UFC/g durante o armazenamento, para *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, respectivamente. A cultura *starter* apresentou populações entre 9,20 e 9,61 log UFC/g no mesmo período. As populações máximas para coliformes totais, bolores e leveduras foram de 2,79 e 3,60 log UFC/g, respectivamente. Os valores de pH diminuíram ao longo do armazenamento, devido à atividade dos microrganismos acidificantes presentes. A umidade variou entre 67,16% e 70,26% no mesmo período. Todos os queijos apresentaram queda na dureza e adesividade ao longo do armazenamento. Na análise sensorial, o queijo T4, com a co-cultura, revelou uma aceitabilidade significativamente maior em todos os atributos avaliados ($p<0,05$). Após 14 dias de armazenamento, o queijo T3 apresentou uma aceitabilidade significativamente inferior aos demais ($p<0,05$). A suplementação de queijo *petit-suisse* T4 com *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BL04 em co-cultura com a cultura *starter* resultou em um produto com excelente potencial comercial, tendo apresentado características sensoriais, microbiológicas e de textura bastante vantajosas.

Palavras chaves: probióticos; queijo *petit-suisse*; *Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium* spp.; *Streptococcus thermophilus*; alimento funcional.

ABSTRACT

The possibility of obtaining a product with wide acceptability in Brazil, and which is mainly targeted at children and has excellent microbiological, nutritional, physical-chemical and organoleptic properties associated with the benefits ascribed to probiotic microorganisms is rather promising. Thus, the aim of the present work was to examine the influence of the probiotic cultures of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04, isolated and in co-culture, on the characteristics of *petit-suisse* cheese produced with the addition of *Streptococcus thermophilus* as a starter culture, throughout the period of refrigerated storage.

Four *petit-suisse* cheese trials were studied (in triplicates): T1 (control - *Streptococcus thermophilus* ST), T2 (ST + *Lactobacillus acidophilus* La-5), T3 (ST + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04) and T4 (ST + La-5 + BL04) and stored at $4\pm1^{\circ}\text{C}$. Microbiological (population of probiotic bacteria, of the *starter* and of contaminants), instrumental texture, physical-chemical and sensory (acceptability test) parameters were evaluated. The sensory evaluation was carried out after 7 and 14 days of storage of the products at $4\pm1^{\circ}\text{C}$, and further analyses were carried out after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage.

The populations of the probiotics always remained above the minimum level recommended for a probiotic food, having varied between 7.22 and 7.60 log CFU/g, and between 8.72 and 8.56 log CFU/g during storage, respectively, for *L. acidophilus* and *B. animalis* subsp. *lactis*. The *starter* culture presented populations between 9.20 and 9.61 log CFU/g in the same period. Coliforms, yeasts and molds presented maximum populations of, respectively, 2.79 and 3.60 log CFU/g. The pH values decreased throughout storage, due to the activity of the acidifying microorganisms present. The moisture ranged from 67.16% up to 70.26% in the same period. All the cheeses studied presented a decrease in hardness and adhesiveness throughout storage. Both after 7 and 14 days, cheese T4 presented the highest sensory acceptance for all attributes evaluated and differed significantly from the other cheeses ($p<0.05$). After 14 days of storage, cheese T3 presented the lowest acceptance and differed significantly from the other cheeses ($p<0.05$). The supplementation of *petit-suisse* cheese T4 with both *L. acidophilus* and *B. animalis* subsp. *lactis* in co-culture with a starter culture resulted in a product with excellent market potential, as it presented favorable sensory, microbiological and texture features.

Keywords: probiotics; *petit-suisse* cheese; *Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium* spp.; *Streptococcus thermophilus*; functional food.

Lista de tabelas e figuras

Tabela 1. Proporções de ingredientes para a produção de <i>petit-suisse</i>	21
Tabela 2. Variáveis empregadas na produção dos queijos <i>petit-suisse</i>	22
Figura 1. Fluxograma 1 para obtenção do queijo <i>quark</i>	25
Figura 2. Fluxograma 2 para o preparo do queijo <i>petit-suisse</i>	26
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>) T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	34
Tabela 4. Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (média e variação) obtidos para os queijos T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	37
Tabela 5. Populações de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (média e variação) obtidas para os queijos T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	40
Tabela 6. Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (média e variação) obtidas para os queijos T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>) T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	43
Tabela 7. Populações de coliformes totais obtidas para os queijos T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	46
Tabela 8. Populações de bolores e leveduras obtidas para os queijos T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), durante o armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	47
Figura 3. Gráfico de análise do perfil de textura de queijo <i>petit-suisse</i> . dureza = força atingida em H; Coesividade = razão entre as áreas A_2 e A_1 ; Adesividade = Trabalho em A_3 ; Elasticidade = razão entre t_2 e t_1 ; Gomosidade = força em H x A_2/A_1	49
Tabela 9. Valores dos coeficientes das correlações dos queijos <i>petit-suisse</i> T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>S. thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i>), T3 (<i>S. thermophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>) e T4 (<i>S. thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>), após e 28 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	53
Tabela 10. Perfil de textura instrumental (média e desvio padrão) dos queijos <i>petit-suisse</i> T1 (<i>S. thermophilus</i>), T2 (<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>), T3 (<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>) e T4 (<i>L. acidophilus</i> + <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>), no produto final (1 dia) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	55
Tabela 11. Resultados obtidos na análise sensorial para os atributos sabor,	

textura e aceitabilidade global dos queijos *petit-suisse* T1 (*S. thermophilus*), T2 (*L. acidophilus* + *S. thermophilus*), T3 (*B. animalis* subsp. *lactis* + *S. thermophilus*) e T4 (*L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis* + *S. thermophilus*), após 7 e 14 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$59

Figuras 4. Perfil de pH, umidade, dureza, aceitabilidade global bem como populações de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, para os queijos *petit-suisse* estudados: T1 (controle-*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), ao longo do armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 28 dias.....61

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	1
1.1 Alimentos funcionais e a saúde humana.....	1
1.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	5
1.1.2 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	7
1.1.3 <i>Streptococcus thermophilus</i>	10
1.2 Produtos lácteos e as culturas probióticas.....	12
1.3 Tecnologia de aplicação de probióticos.....	15
1.4 Comercialização e tecnologia de fabricação de queijo <i>petit-suisse</i>	17
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Delineamento experimental.	20
3.2 Processamentos para obtenção do quark e <i>petit-suisse</i> e descrição das variáveis estudadas no presente trabalho.	21
3.3 Processamento da massa-base de queijo quark (Fluxograma da Figura 1):	23
3.4 Processamento para obtenção do queijo <i>petit-suisse</i> (Fluxograma da Figura 2):	24
3.5 Períodos de armazenamento e amostragem do queijo <i>petit-suisse</i>	27
3.6 Análises físico-químicas.....	28
3.7 Análises microbiológicas.....	28
3.8 Determinação do perfil instrumental de textura	29
3.9 Análise sensorial	30
3.10 Análise estatística.....	31
4.1 Evolução dos parâmetros físico-químicos dos queijos <i>petit-suisse</i> ao longo de seu armazenamento: umidade e pH.....	32
4.3 Evolução das populações microbianas dos queijos <i>petit-suisse</i> ao longo de seu armazenamento	36
4.3.1 Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	36
4.3.2 Viabilidade de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	38
4.3.3 Viabilidade de <i>Streptococcus thermophilus</i>	42
4.3.4 Microrganismos indicadores de contaminação - coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> , bolores e leveduras.....	44
4.4 Textura Instrumental	48
Queijos	54
4.5 Análise Sensorial.....	57
5. Conclusão	64
6. Referências bibliográficas ¹	64
Anexo 1. Preparação do ágar MRS-IM para <i>Lactobacillus acidophilus</i> .Erro! Indicador não de	
Anexo 2- Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética.Erro! Indicador não definido.	
Anexo 3. Ficha para teste de escala hedônica – Aceitabilidade geral.Erro! Indicador não def	
Anexo 4. Recrutamento de provadores.....Erro! Indicador não definido.	

1. Introdução

1.1 Alimentos funcionais e a saúde humana

A demanda crescente por alimentos saudáveis tem estimulado a inovação e o desenvolvimento de novos produtos na indústria alimentícia mundial (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Esses alimentos, que além de promoverem a nutrição básica, promovem a saúde, por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional, são denominados de alimentos funcionais (HALSTED, 2003).

Um alimento funcional pode ser definido como “alimento semelhante em aparência aos alimentos convencionais, consumidos como parte da dieta usual, capaz de produzir demonstrados efeitos metabólicos ou fisiológicos, úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônico–degenerativas, além das funções nutricionais básicas” (LAJOLO, 1999).

Com a crescente demanda por aprovação de alimentos com características funcionais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pelo registro deles, criou um setor específico para avaliar novos produtos ou aqueles existentes, mas com alegações de funcionalidade. Em 1999, instituiu-se a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos - CTCAF (BRASIL, 1999).

Os probióticos e prebióticos destacam-se entre os aditivos alimentares que compõem os alimentos funcionais (ZIEMER & GIBSON, 1998). Os probióticos eram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de

microrganismos vivos que afetam benéficamente os animais hospedeiros, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, que conferem benefícios à saúde e ao bem estar do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004). Conseqüentemente, podem agir em outras áreas do trato gastrointestinal como a boca, estômago e intestino delgado, bem como em sítios não intestinais como vagina e pele, além de uma função complementar, atuando sinergisticamente com os probióticos (ZIEMER & GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999; SANDERS, 2003).

Os simbióticos são definidos como “misturas de probióticos e prebióticos que beneficiam o hospedeiro por melhorarem a sobrevivência e implantarem uma dieta com microbiota viva no trato gastrointestinal do hospedeiro” (ANDERSSON *et al.*, 2001).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais,

reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002).

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989; SAAD, 2006).

As cepas mais utilizadas em alimentos são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que o íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, os locais de preferência para as colonizações intestinais desses microrganismos, que são freqüentemente adicionadas aos alimentos, por terem sua concentração no intestino diminuída ao longo dos anos (JELEN & LUTZ, 1998; BIELECKA *et al.*, 2002).

Diversos autores vêm sugerindo possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro. Entre esses efeitos benéficos, merecem destaque o controle das infecções intestinais, o estímulo da motilidade intestinal, com conseqüente alívio da constipação intestinal, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose, promovendo a atividade da enzima lactase, e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar. Essas observações têm sido atribuídas, em parte, à capacidade da bactéria láctica servir

como um recurso de lactase no intestino delgado, contribuindo para a digestão da lactose em pessoas deficientes em lactase (GOBBETTI *et al.*, 1997; SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; JELEN & LUTZ, 1998; HSU *et al.*, 2005).

Por outro lado, o desequilíbrio da microbiota intestinal pode resultar na proliferação de patógenos com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998).

LIN *et al.* (1998) sugeriram que, em geral, o iogurte propriamente dito, produzido com culturas *starter* de *Streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgarius* (microrganismos que não sobrevivem à passagem pelo trato intestinal, segundo SANDERS & KLAENHAMMER, 2001), pode reverter a diminuição da produção de hidrogenases nos sintomas de má digestão de lactose, quando comparados a lactobacilos de origem intestinal. Outro efeito benéfico conferido à ação de probióticos é a exclusão competitiva. Esse mecanismo impede a colonização da mucosa intestinal por microrganismos potencialmente patogênicos, através da competição dos probióticos por sítios de adesão e por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), peróxido de hidrogênio (em ambientes com oxigênio), diacetil, β -hidroxipropionaldeído (produzido por *Lactobacillus reuteri*) ou peptídios bacteriostáticos ou bacteriocidas e proteínas (DEVUYST & VANDAMME, 1994). Além disso, pode ser citado o estímulo do sistema imunológico, através do estímulo da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do hospedeiro (LEE *et al.*, 2004). Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doenças cardiovasculares. Também são sugeridas,

diminuições das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavirus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (LEE *et al.*, 1999; GOMES & MALCATA, 1999; SREEKUMAR & HOSONO, 2000; NAIDU & CLEMENS, 2000; SAAD, 2006).

A redução no pH fecal e o aumento de ácidos graxos de cadeias curtas foram relatados como consequência do aumento da população fecal de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* em estudos com alimentos. Sendo assim, o aumento da concentração de probióticos e a produção concomitante de metabólitos fermentativos *in vivo* têm uma influência mensurável na fisiologia humana. (DEVUYST & VANDAMME, 1994; SREEKUMAR & HOSONO, 2000; NAIDU & CLEMENS, 2000).

1.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

O gênero *Lactobacillus* compreende cerca de 64 espécies diferentes e se divide em três grupos: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios. *Lactobacillus acidophilus* apresentam-se na forma de bastonete não flagelados, Gram-positivos não formadores de esporos. Sua multiplicação pode ocorrer em temperaturas de até 45°C. Entretanto, a temperatura ótima para sua multiplicação está na faixa entre 35 e 40°C, sendo o pH ótimo entre 5,5 e 6,0 (GOMES & MALCATA, 1999; HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

Segundo SHAH (2001), cepas de *L. acidophilus* produzem ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina e vitamina K, sendo que o produto do seu metabolismo fermentativo principal é o ácido láctico.

A atividade antimicrobiana de cepas de *L. acidophilus* sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem apresentar atividade sobre outros lactobacilos e bifidobactérias foi relatada (MITAL & GARG, 1995; BERNET-CAMARD *et al.*, 1997). Adicionalmente, segundo COCONNIER & SERVIN (2003), cepas de *Lactobacillus* isoladas do trato gastrintestinal humano têm atuado na inibição de bactérias anaeróbicas como *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium difficile*.

Alguns estudos realizados com crianças demonstraram que a administração de *L. acidophilus* sozinho e também juntamente com as culturas *starters* *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus* demonstraram eficácia em estudos pediátricos. Nesses estudos, as duas formulações indicadas para o tratamento da diarreia aguda. *L. acidophilus* juntamente com *B. infantis* demonstraram um decréscimo na incidência de enterocolite em recém nascidos, como consequência da inibição do processo inflamatório (YOUNG & HUFFMAN, 2003).

TEJADA-SIMON *et al.* (1999) estudaram a produção de imunoglobulina A como resposta a toxina colérica, em ratos alimentados com iogurtes contendo *L. acidophilus*, e observaram um aumento na resposta imune, em relação aos animais que receberam o controle.

1.1.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* são representadas por mais de 30 espécies e muitas delas foram isoladas do trato gastrintestinais de humanos e de vários animais. São Gram-positivas, com hastes ramificadas, possuem várias aparências com formas bifurcadas em Y ou V, habitam geralmente o cólon de mamíferos e são anaeróbios estritos. Entretanto, a sensibilidade ao oxigênio pode diferir entre as espécies e entre as cepas da mesma espécie. Não formam esporos, multiplicam-se em temperaturas de 20 a 46°C, sendo que a 60°C não sobrevivem (HARTEMINK *et al.*, 1996; AHN *et al.*, 2001; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2003).

As bifidobactérias são consideradas probióticos, por promoverem mudanças desejadas no cólon, além de produzirem ácidos orgânicos. Dessa maneira, diminuem o pH do cólon e a concentração de bactérias patogênicas. Esses microrganismos aderem à mucosa do cólon, competindo por sítios de adesão com as bactérias patogênicas (BALLONGUE, 1998). Bactérias do gênero *Bifidobacterium* também atuam inibindo a diarreia. Em crianças a predominância das linhagens é de *Bifidobacterium breve* e *B. infantis*; em adultos é de *B. adolescentis* e *B. animalis* subsp. *lactis* (BALLONGUE, 1998; HOPKINS *et al.*, 1998).

B. animalis subsp. *lactis* demonstraram alta taxa de sobrevivência na presença de culturas *starter* e bactérias lácticas na produção de queijos. Entretanto, embora a presença de *B. animalis* subsp. *lactis* aumente a concentração de ácidos acético e láctico nos produtos lácticos, não interferiram nos atributos sensoriais,

indicando que o gênero *Bifidobacterium* não exibe atividade metabólica extensiva sobre os queijos (BOYLSTON *et al.*, 2004).

A seleção das culturas de bifidobactérias para elaboração de produtos fermentados de leite depende da produção de ácido, do tipo de fermentação de polissacarídeos, da proteólise, da capacidade de produzir compostos de aroma e de sintetizar vitaminas e das suas propriedades benéficas à saúde (ARUNACHALAM, 1999).

Uma das maiores limitações à incorporação de bifidobactérias em iogurtes está no pH do produto. O pH da maioria dos iogurtes comerciais está entre 3,7 e 4,3. Entretanto o pH ótimo para a multiplicação de bifidobactérias está entre 6,5 e 7,0. Em pH abaixo de 5,0 esse probiótico já apresenta queda na viabilidade. Devido ao fato da maioria das linhagens de bifidobactérias ser sensível a pH abaixo de 4,6, em aplicações práticas o valor do pH do produto final deve ser mantido acima de 4,6. Caso contrário, as populações de bifidobactérias podem diminuir (VINDEROLA *et al.*, 2002a).

A multiplicação de bifidobactérias em leite é lenta, quando comparada a outras bactérias lácticas como as bactérias do gênero *Lactobacillus*, usadas em produtos lácteos. A competição entre as bifidobactérias e as bactérias lácticas e as mudanças nos perfis dessas bactérias durante o processamento e maturação do queijo deve ser considerado para o aumento da viabilidade de bifidobactérias incorporadas em queijos (GOMES & MALCATA, 1999).

CANGANELLA *et al.* (2000) estudaram a produção de iogurtes a partir de leite de vaca e extrato solúvel de soja inoculados com *B. infantis*. Os iogurtes foram armazenados por 45 dias em temperaturas de 4 e de 12°C. A cepa

alcançou populações acima de 10^7 UCF/g, durante os primeiros 24 dias de armazenamento em ambas as temperaturas testadas. Já com 31 dias de armazenamento a 12°C, a viabilidade diminuiu mesmo no iogurte fabricado com extrato solúvel de soja, que apresentou altas populações até esse período, quando comparado ao iogurte, preparado com leite de vaca.

A viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* e *Bifidobacterium infantis* foi estudada em extrato solúvel de soja fermentados que passavam por processos de liofilização ou *spray-drying* e subseqüentes reidratações, sendo armazenados durante 4 meses em temperaturas de 4°C e 25°C. Foram testadas três formas de armazenamento: potes laminados, garrafas de vidros e garrafas PET. A cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* apresentou maior viabilidade em potes laminados a 4°C e o processo de liofilização foi mais efetivo do que o *spray-drying*, já que *B. infantis* mostrou-se mais sensível ao processo de desidratação, apresentando menor viabilidade em relação ao *B. lactis* (WANG *et al.*, 2004).

HEKMAT & McMAHON (1992) produziram um sorvete probiótico, utilizando cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* em co-cultura com temperatura de fermentação a 29°C. A viabilidade das cepas e a atividade da β -galactosidase foram monitoradas durante 17 semanas. As populações no fim do período do armazenamento foram de 10^6 UFC/mL para *L. acidophilus* e de 10^7 UFC/mL para *B. bifidum*. Tal estudo constatou que o sorvete pode ser um excelente veículo para incorporação dos probióticos, tendo mostrado potencial terapêutico durante as 17 semanas de armazenamento.

1.1.3 *Streptococcus thermophilus*

Atualmente, são conhecidas 39 espécies de *Streptococcus*, das quais somente a espécie *Streptococcus thermophilus* é utilizada como cultura *starter*. O termo *starter* é empregado devido ao fato dessas bactérias iniciarem a produção de ácido no meio em que estão inseridas. A partir da fermentação da lactose, as culturas de *Streptococcus thermophilus* produzem substâncias como ácido fórmico, ácido láctico e pequenas quantidades de CO₂ (FOX *et al.*, 2000; ZISU & SHAH, 2005).

As combinações de culturas mistas de bactérias *starter* e de bactérias probióticas utilizadas na tecnologia de produtos lácteos, compostas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e bifidobactéria podem resultar em estimulação, inibição ou ausência de efeitos sobre a multiplicação e a atividade metabólica dos microrganismos presentes (VINDEROLA *et al.*, 2002).

A adição de culturas em produtos lácteos pode conferir alterações de seu sabor e textura, devido à autólise bacteriana, fenômeno que é caracterizado pela lise da célula, onde há a liberação de todo o seu conteúdo citoplasmático. Nas bactérias *starter*, essa autólise parece ser uma maneira promissora para melhorar o sabor de produtos lácteos onde elas estão inseridas. Células de *Streptococcus thermophilus* sofrem autólise extensivamente ao longo de sua multiplicação (HUSSON-KAO, 2000). Assim sendo, as culturas *starter*, assim como culturas probióticas, influenciam sobre as características físico-químicas e sensoriais dos

queijos (SHAH, 2000).

Além disso, as culturas de *Streptococcus thermophilus* são empregadas diretamente ou em co-cultura com *Lactobacillus*, na produção de mussarela e queijo cheddar (HOLS *et al.*, 2005). A adição de culturas *starter* em produtos probióticos é aconselhável, em função da perda da viabilidade da bactéria probiótica (FOX *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

MEDICI *et al.* (2004) produziram um queijo fresco probiótico, adicionado de *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. bifidum*, e observaram a viabilidade dessas cepas durante 60 dias de armazenamento, além da resposta imune *in vivo*. Nesse estudo, ratos foram alimentados com queijo fresco probiótico durante 2, 5 ou 7 dias consecutivos, sendo que os resultados demonstraram que o queijo fresco probiótico que continha a mistura dessas cepas, exerceu uma importante influência na imunomodulação no intestino.

Pesquisas recentes têm apontado *S. thermophilus* como sendo uma cepa probiótica. A produção de lactase no intestino delgado, por exemplo, é reconhecida como uma atividade probiótica, embora *S. thermophilus* não sobreviva ao trânsito intestinal (REID *et al.*, 2003; SANDERS, 2003).

Entretanto, DROUALT *et al.* (2002) e MATER *et al.* (2005) relataram que *S. thermophilus* é capaz de resistir à passagem pelo trato gastrintestinal, podendo ser classificada como cultura probiótica, mesmo não sendo de origem da microbiota intestinal humana sadia (SHAH, 2000).

1.2 Produtos lácteos e as culturas probióticas

Com o aumento da preocupação com a dieta, as indústrias de laticínios estão respondendo com o desenvolvimento de novos produtos funcionais. Os laticínios brasileiros utilizaram, em 2001, aproximadamente R\$ 52 milhões em investimentos direcionados para o marketing especificamente de produtos lácteos frescos, iogurte, queijo *petit-suisse*, bebidas lácteas e outros (PRIMO, 2002). A produção de queijos no Brasil em 2005 foi de cerca de 553 mil toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2005).

Embora muitas pesquisas em termos de probióticos estejam voltadas para produtos como leites fermentados e iogurtes, esses produtos podem não ser ótimo em relação à manutenção de altas concentrações de algumas cepas (GARDINER *et al.*, 1999). Aliado a esse fato há evidências de que outros alimentos oferecem potencial para a administração dessas culturas. Como exemplo pode ser citado o sorvete de iogurte (DAVIDSON *et al.*, 2000) e produtos nutritivos em pó (INGHAM, 1999). Diversos tipos de queijo também foram testados como veículos para cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, revelando-se apropriados. Dentre os queijos, destacam-se os queijos cheddar (DINAKAR & MISTRY, 1994; GARDINER *et al.*, 1998), gouda (GOMES *et al.*, 1998), cottage (BLANCHETTE *et al.*, 1996), crescenza (GOBBETTI *et al.*, 1997), queijo fresco (ROY *et al.*, 1997; VINDEROLA *et al.*, 2000b), incluindo o queijo minas frescal (BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b), que apresentaram condições mais favoráveis à sobrevivência de culturas probióticas, especificamente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.

Em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o queijo minas

frescal mostrou-se um veículo apropriado para o emprego de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *Streptococcus thermophilus* em co-cultura (BURITI *et al.*, no prelo), *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, individualmente e em co-cultura (ALEGRO *et al.*, 2002), *Lactobacillus acidophilus* La-5, utilizando cultura tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) ou *Streptococcus thermophilus* como culturas *starter* ou não (BURITI *et al.*, 2005b; SOUZA *et al.*, no prelo) e *Lactobacillus paracasei* LBC-82 (BURITI *et al.*, 2005a).

Os referidos microrganismos probióticos revelaram populações superiores ao mínimo requerido para efeito probiótico (10^6 UFC/g), ao longo de todo o período de armazenamento refrigerado dos queijos durante 21 dias. Resultados particularmente promissores foram obtidos para *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82, que revelou populações médias, respectivamente, após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento dos queijos a 5°C, de 6,61, de 6,88, de 7,69 e de 8,22 log UFC/g, nos queijos acidificados com ácido láctico, e de 6,79, de 7,50, de 8,15 e de 8,44 log UFC/g, nos queijos acidificados com cultura láctica mesofílica do tipo O (BURITI *et al.*, 2005). Posteriormente, desenvolveu-se um queijo fresco cremoso simbiótico, adicionado de *Lactobacillus paracasei* e do ingrediente prebiótico inulina, o qual se mostrou um produto alimentício com grande potencial simbiótico (BURITI *et al.*, 2007a; BURITI *et al.*, 2007b).

A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 a 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto que contenha 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE & SALMINEN, 1995). A Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à

Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 1999) recomendou que um alimento funcional probiótico deve apresentar uma concentração mínima de 10^6 UFC/g dentro do prazo de validade do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). Entretanto, no momento, a referida Comissão estabeleceu que a quantidade mínima diária (porção diária) de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC (ANVISA, 2005), o que implica em um consumo de 10 g diárias de um produto contendo 10^7 a 10^8 UFC/g ou mL ou de 100 g diárias de um produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL.

Muitas bactérias lácticas exercem uma importante influência sobre as características físico-químicas e sensoriais dos queijos, desempenhando um papel fundamental, tanto durante a sua produção quanto durante a sua maturação, com a multiplicação dessas culturas no leite resultando na conversão de lactose em ácido láctico, o que irá garantir um pH adequado para a coagulação. Esse fato irá influenciar o pH final do coalho, o conteúdo final de umidade do queijo, bem como o desenvolvimento de suas características sensoriais e de textura durante a maturação (HOIER *et al.*, 1999). Além disso, elas podem ser úteis por possuírem atividade inibitória, através da criação de um ambiente hostil para os microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes, produzindo metabólitos com atividade antimicrobiana, entre eles, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, álcoois, diacetil e bacteriocinas (DILLON & COOK, 1994; SHAH, 2000).

1.3 Tecnologia de aplicação de probióticos

A viabilidade das bactérias probióticas pode ser prejudicada pela presença de substâncias inibitórias formadas durante a produção e o armazenamento do produto. Entre os fatores que podem influenciar a viabilidade dessas bactérias em iogurtes, destacam-se: a cepa empregada, a interação entre as espécies presentes, as condições de cultivo, a produção de peróxido de hidrogênio, a acidez final do produto, a concentração de ácido láctico e acético, a pós-acidificação, a composição da co-cultura e a presença de fatores de crescimento no leite (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; SHAH, 2000; VINDEROLA *et al.*, 2000a). Além disso, a importância de se adicionar um fermento suplementar contendo bactérias probióticas como, por exemplo, *B. animalis* subsp. *lactis* ou *Lactobacillus acidophilus* com populações superiores a 10^6 UFC/mL ou g tem como base a expectativa do aumento da qualidade sensorial do produto e, principalmente, o enriquecimento dos produtos com ingredientes que beneficiam a saúde humana (DAVIDSON *et al.*, 2000).

Entre os microrganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*. Dentre as bactérias do gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L.*

gasseri, *L. farciminis*, *L. kefiranofaciens*, *L. panis*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS *et al.*, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SANDERS, KLAENHAMMER, 2001).

Em geral, as bactérias probióticas são exigentes quanto aos nutrientes. *L. acidophilus* apresenta necessidades nutricionais complexas. Aminoácidos e fatores de crescimento, como pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina são essenciais (DU PLESSIS *et al.*, 1996). A necessidade de diversos fatores de crescimento para a multiplicação de bifidobactérias *in vitro* foi relatada, bem como a necessidade de tiamina, piridoxina, ácido fólico e cianocobalamina (MODLER, 1994; ARUNACHALAM, 1999). Segundo SHAH & RAVULA (2000), níveis de 12 e de 16% de sacarose inibiram a multiplicação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. em iogurte.

Atualmente, para a fabricação de leites fermentados contendo probióticos, adicionam-se esses microrganismos em conjunto com as bactérias convencionais do iogurte - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* - para facilitar o processo de fermentação (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; DAVE & SHAH, 1998; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A seleção de uma cultura *starter* apropriada para cada cultura probiótica é fundamental para a obtenção de produtos frescos fermentados com boa sobrevivência de culturas probióticas durante sua vida de prateleira (SAXELIN *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000). A cultura *starter* deve produzir compostos que favoreçam a multiplicação da cultura probiótica ou promover redução da tensão de oxigênio (SAARELA *et al.*, 2000). Outro fator importante na utilização de co-culturas é a sua capacidade de estabilizar o aroma do iogurte, por aumentar

acentuadamente o teor de acetaldeído (composto que participa do aroma de diversos produtos lácteos) e de contribuir para sua textura adequada, segundo estudos de KWAK *et al.* (1996) e ROSSI (1993), respectivamente.

1.4 Comercialização e tecnologia de fabricação de queijo *petit-suisse*

O queijo *petit-suisse* é um queijo feito com leite desnatado, adicionado de creme. Esse produto possui consistência cremosa, sendo elaborado a partir de uma massa obtida pelo processo de coagulação mista, podendo ser adicionado de condimentos doces ou salgados. Durante o processo de fabricação, o fermento é adicionado até que a acidez desejável seja atingida. Após a drenagem do soro, a massa concentrada é resfriada, devendo apresentar extrato seco total em torno de 16%. No Brasil, para a fabricação de queijo *petit-suisse* utiliza-se centrífuga para efetuar o processo de separação da massa, produzindo o queijo *quark*, que é a base utilizada, juntamente com açúcar, creme e polpa de frutas (LOPES, 2005). Entretanto, quando volumes reduzidos de produto são obtidos, essa dessoragem pode ser realizada em sacos de panos estéreis.

O queijo *petit-suisse* é um queijo de alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 2002). Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, até o máximo de 30% m/m, classifica-se o produto como queijo *petit-suisse* com adições. No caso em que os ingredientes opcionais sejam, exclusivamente, açúcares e/ou se adicionem substâncias aromatizantes/saborizantes, classifica-se como queijo *petit-*

suisse com açúcar e/ou aromatizados/saborizados. O queijo *petit-suisse* deve ser envasado em embalagens de materiais adequados às condições de armazenamento, previstas de forma a conferir uma proteção adequada ao produto. Deve ser conservado e comercializado a temperaturas não superiores a 10°C. De acordo com os critérios microbiológicos, o queijo *petit-suisse* deve cumprir com o estabelecido no Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos, para queijos de muita alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundante (BRASIL, 2002).

O queijo *petit-suisse* é consumido como sobremesa e é dirigido principalmente ao público infantil. O produto tem boa aceitação, mas o consumo ainda é pequeno, quando comparado ao de outros países. Segundo pesquisa feita em 1998, o consumo *per capita* total no Brasil foi de 230 g naquele ano (ACNIELSEN, 1999). Já segundo nova pesquisa, o mercado brasileiro de *petit-suisse* movimentou R\$ 404 milhões em 2005 (consumo *per capita* de 250 g), com a venda de 46 mil toneladas do produto, quando todas as marcas oferecidas nas gôndolas nos supermercados são consideradas (DATAMARK, 2007).

Em geral, o queijo *petit-suisse* possui características semelhantes ao queijo *quark*, como elasticidade, viscosidade e viscoelasticidade, as quais determinam a sua reologia e influenciam na consistência e estabilidade final (FOX *et al.*, 2000).

As propriedades reológicas dos queijos exercem um papel fundamental por afetarem diretamente as características de manipulação, fracionamento e embalagem, as qualidades de textura e de consumo, a sua utilização como ingrediente, a sua capacidade de conservar uma determinada forma a uma dada temperatura e a sua capacidade de reter gases e formar olhaduras.

Características como a composição do queijo, o arranjo estrutural de seus componentes (a sua microestrutura), o estado físico-químico de seus componentes e sua macroestrutura (presença de mais ou menos pontos heterogêneos como junções, rachaduras ou fissuras) refletem diretamente sobre essas propriedades (FOX *et al.*, 2000).

O queijo *petit-suisse* tem apresentado boas condições de manutenção da viabilidade dos probióticos e características bastante peculiares e promissoras para um alimento funcional. Entretanto, nos trabalhos com queijo *petit-suisse* probiótico e simbiótico desenvolvidos em Maruyama *et al.* (2006) e Maruyama *et al.* (2005) e em Cardarelli (2006), respectivamente, a variável cepa probiótica e interação entre diferentes cepas probióticas e com a cultura *starter* não foi estudada. Sendo assim, considerou-se a possibilidade de avaliar o efeito da adição de dois microrganismos probióticos isolados e em co-cultura no produto probiótico elaborado com a cultura *starter* de *S. thermophilus*, utilizando a formulação de queijo *petit-suisse* selecionada em Maruyama *et al.* (2006) e Maruyama *et al.* (2005).

2. Objetivos

- O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do emprego de culturas probióticas compostas pelos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BL04, isolados e em co-cultura, em queijo *petit-suisse* processado com a adição de *Streptococcus thermophilus*, sobre as características do produto, ao longo do seu armazenamento.

3. Materiais e Métodos

3.1 Delineamento experimental.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema fatorial 4x5 (BARROS-NETO *et al.*, 2003), constituído de 4 tipos de combinações em termos da adição ou não de 1 ou das 2 culturas probióticas durante a produção dos queijos (somente *Streptococcus thermophilus*; *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus*; *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) e de 5 tempos (1, 7, 14, 21 e 28 dias após o processamento), com 3 repetições.

3.2 Processamentos para a obtenção da massa-base de queijo quark e de queijo *petit-suisse* e descrição das variáveis estudadas.

O processamento do queijo *quark* probiótico foi desenvolvido experimentalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo (CARDARELLI, 2006; CARDARELLI *et al.*, *no prelo*), com a adição dos microrganismos potencialmente probióticos de *Lactobacillus acidophilus* Lac 4 (Danisco, Dangé, França), *B. animalis* subsp. *lactis* BL04 (Danisco) e da cultura *starter Streptococcus thermophilus* TA040 (Danisco), conforme apresentado a seguir no Fluxograma 1 da Figura 1. A cultura potencialmente probiótica de *Lactobacillus acidophilus* Lac4 foi substituída por uma cultura de *Lactobacillus acidophilus* comprovadamente probiótica (JUNTUNEN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004) - *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

A formulação do queijo *petit-suisse* probiótico foi desenvolvida experimentalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP (MARUYAMA *et al.*, 2006), onde foi utilizado creme de leite tradicional esterilizado (25% de gordura; Nestlé, Araçatuba, Brasil), polpa de morango integral congelada sem conservantes (Maisa, Mossoró, Brasil), açúcar refinado União (Coopersucar-União, Limeira, Brasil), corante natural carmim de cochonilla (Plury Química, Diadema, Brasil), aroma natural idêntico ao de morango (Mylner, São Paulo, Brasil), gomas xantana, Carragena e Guar (Grinsted 80, CY-500 e

178-B, respectivamente, Danisco, Cotia, Brasil). As proporções de ingredientes encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Ingredientes utilizados na elaboração de queijo *petit-suisse* e respectivas proporções.

Ingredientes	Proporção adicionada (%)
Massa-base de queijo quark	63,90
Polpa de morango	11,50
Creme de leite	13,72
Açúcar	10,00
Goma Guar	0,375
Goma Carragena	0,1875
Goma Xantana	0,1875
Corante	0,08
Aroma	0,05
Total	100,00

A massa-base de queijo *quark* foi preparada com quatro tipos de combinações de culturas, conforme descrito na Tabela 2, tendo resultado em 4 diferentes tratamentos de queijo *petit-suisse* estudados. Foram realizadas 3 produções de cada queijo estudado.

Tabela 2. Variáveis empregadas na elaboração dos queijos *petit-suisse* estudados.

Queijos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ²	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ³	<i>Streptococcus thermophilus</i> ⁴
T1 ¹	-	-	+
T2	+	-	+
T3	-	+	+
T4	+	+	+

(+) presença da cultura; (-) ausência da cultura.

¹ Controle

² Cultura comprovadamente probiótica de *Lactobacillus acidophilus* (La-5, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

³ Cultura potencialmente probiótica de *B. animalis* subsp. *lactis* (BI-4, Danisco, Dangé, França).

⁴ Cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* (TA 040, Danisco, Dangé, França).

3.3 Processamento da massa-base de queijo quark (Fluxograma da Figura 1):

1. Foram transferidos 18 litros de leite pasteurizado (Salute, Descalvado, Brasil) para um recipiente, aquecidos, em banho de água, até temperatura de 37°C;

2. O leite aquecido foi transferido para caixas térmicas, onde adicionou-se cloreto de cálcio (2,5 g/10 L de leite), seguido de homogeneização. Nesta etapa, foram adicionadas as culturas probióticas (*L. acidophilus* 5% m/v para os queijos T2 e T4 e *B. animalis* subsp. *lactis* 5% m/v para os queijos T3 e T4) e a cultura *starter* (*S. thermophilus* 5% m/v para os queijos T1, T2, T3 e T4), sendo realizada uma nova homogeneização. As três culturas empregadas foram culturas liofilizadas do tipo DVS (*direct vat set*, para a adição direta ao leite, durante a elaboração do produto) e foram mantidas congeladas (cerca de -18°C), conforme

instrução dos fabricantes.

3. Aguardou-se até o leite atingir pH 6,3 a 6,5 (cerca 90 minutos) e adicionou-se coalho (Ha-la 88-92% pepsina bovina + 8-12,5% quimosina bovina; Christian Hansen, Valinhos, Brasil) previamente diluído (0,05 g em 50 mL de água fervida e resfriada) na proporção de 0,05 g/10 L de leite, seguido de homogeneização;

4. Aguardou-se até atingir pH 5,6 a 5,8 (cerca de 40 minutos) para a coagulação, sendo então a coalhada cortada com auxílio de uma lira;

5. Após 15 a 30 min procedeu-se a dessoragem, transferindo-se a massa para sacos de algodão previamente esterilizados. A massa foi mantida em câmara a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14 a 15 horas;

6. O *quark* foi mantido sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$), para a elaboração da mistura para obtenção do queijo *petit-suisse*.

3.4 Processamento para obtenção do queijo *petit-suisse* (Fluxograma da Figura 2):

O queijo *petit-suisse* foi preparado a partir da massa-base de queijo *quark*, conforme apresentado no Fluxograma da Figura 2 e descrito a seguir.

1. Foi realizada a mistura da massa-base de queijo *quark* obtida conforme descrito no item 3.2 aos demais ingredientes da formulação, em suas respectivas proporções, de acordo com a tabela 1;

2. O produto foi homogeneizado em misturador Geiger UMMSK-12 (Geiger, Pinhais, Brasil). Após a homogeneização, o produto foi embalado em recipientes plásticos de polipropilenos brancos, com 68 mm x 32 mm x 55 ml (Diâmetro de

selagem x Altura x Volume útil) próprios para alimentos (TRIE ADITIVOS PLÁSTICOS LTDA., São Paulo, Brasil), com capacidade para 40 g, selados (seladora Delgo nº 1968 Cotia, Brasil) com selo aluminizado (alumínio + polietileno) 68 mm de diâmetro e armazenado sob refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$) por até 28 dias, para a realização das análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

Fluxograma de obtenção do queijo *quark*

Figura 1. Fluxograma de processamento empregado para a obtenção da massa-base de queijo *quark*.

Fluxograma – Mistura para preparo do queijo *petit-suisse*

Figura 2. Fluxograma de processamento empregado para a obtenção de queijo *petit-suisse*, a partir da massa-base de queijo quark.

3.5 Períodos de armazenamento e amostragem do queijo *petit-suisse*

Os diferentes queijos *petit-suisse* (probióticos e controle) foram armazenados a 4±1°C e foram realizadas amostragens no produto final (1 dia) e semanalmente, após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, quando, então, foram realizadas as análises descritas a seguir, exceto a análise sensorial, a qual foi realizada em dois períodos - após 7 e após 14 dias de armazenamento. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas a partir de amostras provenientes das três produções de cada um dos quatro queijos *petit-suisse* estudados. A determinação do perfil instrumental de textura foi realizada a partir de amostras provenientes da terceira produção de cada queijo *petit-suisse* estudado.

3.6 Análises físico-químicas

- Teor de umidade – Método gravimétrico de secagem em estufa a vácuo a 70°C modelo 440/D (Nova Ética, São Paulo, Brasil), a partir de 5 g de amostras;
- pH em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2A04-IF (Analyser);

As análises de umidade e pH foram realizadas em duplicata e triplicata, respectivamente.

3.7 Análises microbiológicas

Porções de 25 g de produto (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

Foram efetuadas contagens das populações dos microrganismos probióticos - *Lactobacillus acidophilus* (para os queijos T2 e T4) e *B. animalis* subsp. *lactis* (para os queijos T3 e T4), do starter *Streptococcus thermophilus* (para os queijos T1, T2, T3 e T4). As populações de contaminantes (*E. coli*, coliformes totais, bolores e leveduras) foram determinadas para todos os queijos estudados. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicata.

Para a contagem das bactérias probióticas, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Para a contagem de *L. acidophilus*, foi adicionado ágar MRS-IM (Anexo 1), fundido e

resfriado a cerca de 45°C e adicionado de solução estéril a 20% de maltose. Para a contagem de *B. animalis* subsp. *lactis*, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid), acrescido de propionato de sódio (3%) e cloreto de lítio (2%), de acordo com VINDEROLA & REINHEIMER (2000). Após homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 3 dias em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid). Para a contagem de *Streptococcus thermophilus*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas que receberam ágar M17 (Oxoid) adicionado de lactose (Oxoid), fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C (RICHTER & VEDAMUTHU, 2001), por 3 dias.

Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ para *Escherichia coli*, denominadas Petrifilm™EC (3M Microbiology, St. Paul, EUA), para a contagem de coliformes e de *E. coli*, e para placas Petrifilm™ Yeasts and Moulds Count Plates (Petrifilm™YM, 3M Microbiology) para a contagem de bolores e leveduras, de acordo com as instruções do fabricante. A incubação de Petrifilm™EC foi realizada a 35°-37°C por 24 horas. A incubação de Petrifilm™ YM foi realizada a 25°C por 5 dias.

3.8 Determinação do perfil instrumental de textura

A determinação do perfil instrumental de textura das amostras foi feita imediatamente após a sua retirada da câmara de refrigeração onde foram armazenadas a 4±1°C. Foram utilizadas 7 amostras de cada tratamento de queijo

em cada período de análise. As análises foram realizadas utilizando-se o analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), utilizando-se dispositivo cilíndrico de alumínio com 25 mm de diâmetro e realizando penetração de 1 cm. A velocidade empregada foi de 1 mm s⁻¹. Os parâmetros dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade foram determinados, empregando-se o programa “Texture Expert for Windows” - versão 1.20 (Stable Micro System).

3.9 Análise sensorial

A análise sensorial das amostras de queijo *petit-suisse* foi realizada após 7 e 14 dias de armazenamento a 4±1°C. Tal análise foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Ciências Farmacêuticas (Anexo 2 – Protocolo nº 154/2005). Para esse fim, foi empregado o teste de aceitabilidade (Modelo de ficha utilizada no teste - Anexo 3), utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos (LAWLESS & HEYMANN, 1999). A análise foi conduzida com 35 provadores não treinados (consumidores), de ambos os sexos em cada etapa. O teste utilizou amostras de 20 g de queijos de cada um dos tratamentos estudados, todos fabricados no mesmo dia, em paralelo, servidas na própria embalagem onde foram acondicionadas, codificadas com números aleatórios de três dígitos. Os provadores foram instruídos a avaliar os queijos quanto a sabor, textura e aceitabilidade global, utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = não gostei e nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

A comparação dos dados obtidos entre os queijos para os diferentes dias (7 e 14) e diferentes tratamentos foi realizada através da análise de variância de 2 fatores, com a utilização do Teste de Tukey hsd , considerando-se o nível de significância $p < 0,05$ (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O programa estatístico *Statistical Analysis System* foi utilizado nos cálculos estatísticos (SAS, 1992).

3.10 Análise estatística

A comparação dos resultados das diferentes análises (microbiológica, físico-química e dos diferentes parâmetros de textura avaliados), para diferentes dias de cada tratamento e para diferentes tratamentos comparados em um mesmo dia de amostragem, foi realizada através de análise de variância de um fator, com a utilização do Teste de Tukey hsd, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$ (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

4 Resultados e discussão

4.1 Evolução dos parâmetros físico-químicos dos queijos *petit-suisse* ao longo de seu armazenamento: umidade e pH

A formulação de queijo *petit-suisse* probiótico utilizada como queijo-controle (sem a adição de prebióticos) em CARDARELLI *et al.* (*no prelo*) apresentou 3,83% de gordura, 9,93% de proteína, 18,53% de carboidratos, 0,90% de cinzas e 66,81% de umidade. Sendo assim, o produto estudado no presente trabalho apresentou composição provavelmente semelhante, uma vez que a mesma formulação foi mantida, exceto pela substituição da gelatina (0,45%) e gomas xantana (0,45%) por uma mistura contendo as gomas xantana (0,1875%), carragena (0,1875%) e guar (0,375%), segundo MARUYAMA *et al.* (2006).

Os valores de umidade e pH obtidos após a realização das análises físico-químicas nos queijos durante o período de armazenamento refrigerado são apresentados na Tabela 3. Os quatro queijos *petit-suisse* estudados apresentaram valores elevados de umidade. Entretanto, tal resultado era esperado, uma vez que o queijo *petit-suisse* é classificado como um produto de alta umidade, de acordo com a legislação brasileira e nenhuma alteração significativa durante o armazenamento dos diferentes queijos foi observada ($p > 0.05$). A legislação brasileira vigente especifica que o teor de umidade deve estar acima de 55%, na classificação de queijos de alta umidade (ANVISA, 2001).

Embora com algumas variações significativas entre os diferentes queijos estudados ($p < 0,05$), a umidade permaneceu sempre entre 67% e 71%.

Resultados semelhantes foram relatados por MORGADO & BRANDÃO (1998) e VEIGA (1999) que observaram valores de umidade entre 60,9% e 70,5% em queijo *petit-suisse*.

CARDARELLI (2006) em estudo no qual desenvolveu um queijo *petit-suisse* simbiótico, observou padrões de umidade variando entre 60,90% a 66,97%. MARUYAMA *et al.* (2006) estudaram diferentes combinações de gomas na produção de queijo *petit-suisse* e não observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) durante 21 dias de armazenamento quanto à umidade dos produtos.

Todos os queijos estudados no presente trabalho apresentaram queda nos valores de pH ao longo do armazenamento dos produtos (Tabela 3). Entretanto, é importante enfatizar que houve uma importante diminuição de pH durante o armazenamento em queijos que não eram adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (T1 e T3). Já os queijos suplementados com a cepa probiótica (T2 e T4) apresentaram 3 quedas de pH significativas ($p < 0,05$) ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado.

VEIGA (1999) relatou que a faixa de pH de seis marcas comerciais de queijo *petit-suisse* variaram de 4,42 a 4,52, valores próximos aos obtidos neste trabalho. MORGADO & BRANDÃO (1998) apresentam como padrões de qualidade, adotados industrialmente, produtos com pH variando de 4,20 a 4,65, portanto ligeiramente inferiores aos obtidos no presente trabalho. Entretanto, deve ser salientado que tal diferença é conseqüente da utilização de *Streptococcus thermophilus* como cultura *starter* no presente trabalho. A cultura normalmente utilizada é *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ou *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (mesofílica) e a temperatura de coagulação é de 30°C,

enquanto que, no presente trabalho, a temperatura de 37°C foi utilizada, portanto superior ao processo tradicional, em virtude da característica termofílica da cultura *starter* empregada.

De fato, VEIGA & VIOTTO (2000) produziram queijo *petit-suisse* por ultrafiltração adicionando cepas mistas de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Os autores obtiveram valores de pH entre 4,28 e 4,40, valores estes inferiores, entretanto relativamente próximos aos dos queijos T3 e T4 do presente trabalho.

A redução dos valores de pH é um processo causado pela produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos resultantes do metabolismo da cultura *starter* e das culturas probióticas (BADIS *et al.*, 2004; GONCU & ALPKENT, 2005). Assim como no presente trabalho, tal fato é observado em outros tipos de queijo, como o minas frescal (BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b).

Outras bactérias lácticas como o *L. acidophilus*, produzem principalmente ácido láctico, enquanto que as bifidobactérias produzem ácido acético mais láctico na proporção de 3:1 (SHAH, 2000).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos para os queijos T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), durante o armazenamento a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

Queijos	Dias	pH	Umidade (%)
T1	1	4,81 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	70,26 $\pm$ 1,76 ^{Aa}
	7	4,76 $\pm$ 0,08 ^{Aa}	69,95 $\pm$ 0,31 ^{Aa}
	14	4,61 $\pm$ 0,17 ^{ABb}	69,31 $\pm$ 0,89 ^{Aa}
	21	4,59 $\pm$ 0,12 ^{Ab}	69,69 $\pm$ 1,51 ^{Aa}
	28	4,53 $\pm$ 0,11 ^{Ab}	69,08 $\pm$ 0,48 ^{Aa}
T2	1	4,84 $\pm$ 0,17 ^{Aa}	68,91 $\pm$ 1,75 ^{Aa}
	7	4,76 $\pm$ 0,15 ^{Aab}	68,78 $\pm$ 1,15 ^{Ba}
	14	4,70 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	68,16 $\pm$ 1,58 ^{Aa}
	21	4,59 $\pm$ 0,09 ^{Ac}	68,83 $\pm$ 1,51 ^{ACa}
	28	4,55 $\pm$ 0,06 ^{Ac}	68,44 $\pm$ 1,79 ^{AbA}
T3	1	4,70 $\pm$ 0,17 ^{Aa}	68,22 $\pm$ 0,75 ^{Aa}
	7	4,63 $\pm$ 0,18 ^{Aab}	67,67 $\pm$ 0,56 ^{Ba}
	14	4,52 $\pm$ 0,13 ^{Bb}	67,89 $\pm$ 0,11 ^{Aa}
	21	4,48 $\pm$ 0,12 ^{Ab}	67,17 $\pm$ 0,74 ^{Ba}
	28	4,45 $\pm$ 0,09 ^{Ab}	67,64 $\pm$ 1,08 ^{Ba}
T4	1	4,83 $\pm$ 0,14 ^{Aa}	69,50 $\pm$ 1,75 ^{Aa}
	7	4,70 $\pm$ 0,10 ^{Ab}	68,93 $\pm$ 0,93 ^{Ba}
	14	4,56 $\pm$ 0,10 ^{Bc}	67,16 $\pm$ 1,86 ^{Aa}
	21	4,50 $\pm$ 0,10 ^{Ac}	67,69 $\pm$ 1,16 ^{BCa}
	28	4,48 $\pm$ 0,01 ^{Ac}	67,87 $\pm$ 1,54 ^{Ba}

^{A,B,C} : letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento, de acordo com o Teste de Tukey.

^{a,b,c} : letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para o mesmo queijo, de acordo com o Teste de Tukey.

4.3 Evolução das populações microbianas dos queijos *petit-suisse* ao longo de seu armazenamento

4.3.1 Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*

As evoluções das populações de *Lactobacillus acidophilus* observadas nos queijos *petit-suisse* T2 e T4, no produto final (1 dia) e aos 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, são apresentados na Tabela 4.

Vários trabalhos propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 e 10^9 UFC/g, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE & SALMINEN, 1995; BLANCHETTE, 1996; HOEIR *et al.*, 1999). No presente trabalho, durante todo o período armazenamento refrigerado, os queijos T2 e T4 apresentaram populações de 7 log UFC/g de *L. acidophilus*. Observou-se que a bactéria *starter* não influenciou nas populações de *L. acidophilus* e também na acidez do produto, visto que as populações obtidas em ambos os queijos foram bem próximas e não diferiram estatisticamente ($p>0,05$).

As populações observadas no queijo T4, adicionado de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparadas àquelas do queijo T2 adicionado apenas de *S. thermophilus* e de *L. acidophilus*, o que demonstra que não houve sinergismo entre as cepas no produto que foi formulado com as duas culturas probióticas em co-cultura. Possivelmente, o metabolismo dessas culturas não influenciou nas populações de *L. acidophilus* ao longo do armazenamento. Mesmo assim, o produto apresentou populações superiores às populações mínimas que um

alimento funcional probiótico deve apresentar dentro do prazo de validade do produto, particularmente quando se leva em consideração o consumo de 10 a 100 g diárias do produto. A referida ingestão resultaria em um consumo diário de 10^8 a 10^9 UFC de *L. acidophilus*, o que está de acordo com a recomendação atual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

RYBKA & KAILASAPATHY (1995) verificaram em iogurte ABT (pH 4,3), produzido com *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*, que as populações de *L. acidophilus* permaneceram com 7 log UFC/g durante 36 dias de armazenamento a 4°C. Resultados semelhantes foram encontrados por CARDARELLI & SAAD (2003), que monitoraram as populações de *L. acidophilus* em queijos *petit-suisse* adicionados de prebióticos durante 21 dias de armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

MARUYAMA *et al.* (2006) observaram populações de *L. acidophilus* superiores a 6 log UFC/g ao longo do armazenamento refrigerado, quando o probiótico era incorporado em queijo *petit-suisse*. Os autores também constataram que a viabilidade não sofreu influência do pH durante o armazenamento.

ONG *et al.* (2006) produziram queijo cheddar com *Lactobacillus acidophilus* 4962 e L10 e observaram populações destas cepas superiores a 7 log UFC/g durante 6 meses de armazenamento refrigerado a 4°C.

SOUZA *et al.* (2007) produziram queijo minas frescal com adição de *Lactobacillus acidophilus* e a cultura *starter S. thermophilus* e observaram populações de *L. acidophilus* superiores a 6 log UFC/g durante 14 dias de armazenamento refrigerado a 5°C.

Tabela 4. Populações de *Lactobacillus acidophilus* (média e variação) obtidos para os queijos T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/g)				
Queijos				
T2			T4	
Dias	Média	Variação*	Média	Variação*
1	7,46 ^{Aa}	7,13 – 7,64	7,25 ^{Aa}	7,03 – 7,36
7	7,57 ^{Aa}	7,00 – 7,96	7,60 ^{Aa}	7,19 – 7,75
14	7,45 ^{Aa}	7,13 – 7,61	7,45 ^{Aa}	7,11 – 7,75
21	7,29 ^{Aa}	7,00 – 7,44	7,25 ^{Aa}	6,90 – 7,50
28	7,36 ^{Aa}	7,08 – 7,62	7,22 ^{Aa}	6,57 – 7,50

*Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^A: letra maiúscula sobrescrita igual na mesma linha indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento, de acordo com o Teste de Tukey.

^a: letra minúscula sobrescrita igual na mesma coluna indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para o mesmo queijo, de acordo com o Teste de Tukey.

4.3.2 Viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis*

A evolução das populações de *B. animalis* subsp. *lactis* durante o armazenamento dos queijos *petit-suisse* T3 e T4 são apresentadas na Tabela 5. Ambos os queijos apresentaram populações de 8 log UFC/g ao longo do armazenamento, não havendo diferença significativa entre os queijos T3 e T4 e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada queijo ($p>0,05$). Essa

observação demonstra, mais uma vez, que o produto em co-cultura não influenciou na evolução das populações de microrganismos probióticos. Tal fato demonstrou que *B. animalis* subsp. *lactis* sobrevive muito bem durante toda a vida de prateleira de queijo *petit-suisse*. Resultados semelhantes foram encontrados por CARDARELLI & SAAD (2003) que obtiveram populações de 7 log UFC/g de *B. animalis* subsp. *lactis* durante 28 dias de armazenamento refrigerado de queijo *petit-suisse*.

MARUYAMA *et al.* (2006) estudaram o efeito de diferentes combinações gomas sobre os parâmetros de textura do queijo *petit-suisse* durante 21 dias de armazenamento a 4°C. Além disso, foi monitorada a população de *B. animalis* subsp. *lactis*, que se manteve acima de 7,30 UFC/g durante os 21 dias de armazenamento dos produtos.

RYBKA & KAILASAPATHY (1995) verificaram que em iogurte ABT (pH 4,3), produzido com adição de *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*, as populações de *B. animalis* subsp. *lactis* permaneceram em concentrações de 7 log UFC/g durante 36 dias de armazenamento a 4°C.

DAVIDSON *et al.* (2000) desenvolveram iogurtes congelados contendo *B. animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, além das culturas *starter* de *Streptococcus thermophilus* e de *L. bulgaricus*. Os iogurtes contendo as culturas mistas foram armazenados durante 11 semanas a -20°C, sendo que as populações de *B. lactis* mantiveram-se ao redor de 7 log UFC/mL durante todo o período de armazenamento.

CANGANELLA *et al.* (2000) estudaram a produção de iogurtes a partir de leite de vaca e extrato solúvel de soja, inoculado com *B. infantis*. Os iogurtes

foram armazenados por um período de 45 dias em temperaturas de 4 e de 12°C. A cepa alcançou populações acima de 7 log UCF/g, durante o período de 24 dias de armazenamento.

Semelhantemente, AKALIN *et al.* (2004) estudaram a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* e *B. animalis* em iogurte contendo FOS (frutooligossacarídeos), durante o armazenamento de 28 dias a 4°C. As populações de *B. animalis* subsp. *lactis* e de *B. animalis* observadas permaneceram com 7 log UFC/g, respectivamente, até 21 dias e durante todo o período de armazenamento.

VINDEROLA *et al.* (2000c) observaram que a viabilidade de bifidobacteria era aumentada com a presença de outra cepa probiótica, resultando no aumento da população da bactéria avaliada, evento que não foi observado no presente trabalho. Os autores reportaram que a viabilidade da cepa diminuía 1 log UFC/g com 60 dias de estudo, apesar de o microrganismo manter populações de, no mínimo 10⁶ UFC/g, o que não foi observado no presente trabalho com *B. animalis* subsp. *lactis* durante o armazenamento refrigerado de 28 dias do queijo *petit-suisse*.

CORRÊA *et al* (*no prelo*) testaram, em manjar branco, a mesma cepa de *B. lactis* (BL-04) que foi usada no presente trabalho. Similarmente ao que foi observado no presente estudo com *petit-suisse* produzido com *S. thermophilus* como cultura *starter* e adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* (individualmente ou em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*), os autores relataram que, quando *B. animalis* subsp. *lactis* era adicionado em co-cultura com *L. paracasei*, durante a produção de manjar branco, a população de *B. animalis* subsp. *lactis* se manteve

quase a mesma, em comparação com a cultura adicionada individualmente.

As populações de *B. animalis* subsp. *lactis* observadas para os queijos T3 e T4, no presente trabalho, foram sempre superiores às populações de *L. acidophilus*. Tais resultados não eram esperados, uma vez que as bifidobactérias são descritas como mais sensíveis a variações de pH e menos tolerantes a temperaturas de refrigeração (LOURENS-HATTING & VILJOEN, 2001).

Tabela 5. Populações de *B. animalis* subsp. *lactis* (média e variação) obtidas para os queijos T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Populações de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (log UFC/g)				
Queijos				
T3			T4	
Dias	Média	Variação*	Média	Variação*
1	8,72 ^{Aa}	8,02 – 8,96	8,59 ^{Aa}	7,84 – 8,93
7	8,60 ^{Aa}	8,05 – 8,95	8,57 ^{Aa}	8,00 – 8,91
14	8,56 ^{Aa}	8,04 – 8,92	8,70 ^{Aa}	8,03 – 8,95
21	8,64 ^{Aa}	8,20 – 8,96	8,66 ^{Aa}	8,00 – 8,96
28	8,61 ^{Aa}	8,13 – 8,87	8,65 ^{Aa}	8,00 – 8,90

*Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^A: letra maiúscula sobrescrita igual na mesma linha indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes queijos no mesmo período, de acordo com o Teste de Tukey.

^a: letra minúscula sobrescrita igual na mesma coluna indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para o mesmo queijo, de acordo com o Teste de Tukey.

4.3.3 Viabilidade de *Streptococcus thermophilus*

A evolução das populações de *Streptococcus thermophilus* durante o armazenamento dos queijos *petit-suisse* T1, T2, T3 e T4 encontra-se na Tabela 6. A cultura *starter* apresentou populações de 9 log UFC/g durante os 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. As populações da cultura *starter* não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os queijos estudados, e para cada queijo ao longo dos diferentes dias de armazenamento ($p>0,05$). A elevada população do *starter*, associada com a presença dos microrganismos probióticos nos queijos estudados resultou nas reduções significativas de pH relatadas anteriormente (tabela 3).

Segundo SHAH (2000), a adição da cultura *starter* auxiliaria na quebra da caseína do leite em oligopeptídeos, degradados posteriormente em peptídeos e aminoácidos, por ação das peptidases. Tal processo poderia auxiliar a multiplicação das cepas probióticas nos queijos *petit-suisse*, visto que os *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* se multiplicam vagarosamente no leite, devido à baixa concentração de aminoácidos livres e peptídeos.

Segundo SVENSSON (1999), a incorporação de *S. thermophilus* também pode ser útil em tornar o ambiente do queijo mais anaeróbio, pois esse microrganismo tem alta capacidade de utilização de oxigênio dissolvido no meio. Esse efeito poderia ser vantajoso, já que bifidobactérias são anaeróbias e lactobacilos são anaeróbios facultativos. Sendo assim, a cultura *starter* torna o ambiente mais propício para a multiplicação das culturas probióticas.

VINDEROLA *et al.* (2000b) realizaram um estudo com queijo fresco e

adicionaram *S. thermophilus* como cultura *starter* em co-cultura com cepas probióticas de *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *L. casei*. Nesse estudo a cepa de *S. thermophilus* atingiu populações superiores a 8 log UFC/g, semelhantemente às populações observadas no presente trabalho.

OKASAKI *et al.* (2001), em estudo com queijo minas frescal adicionado de cultura ABT, composta pelos microrganismos *L. acidophilus*, *S. thermophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, obtiveram populações de 8 log UFC/g para *S. thermophilus* durante 21 dias de armazenamento refrigerado dos produtos.

Atualmente, cepas de *S. thermophilus* são consideradas probióticas por alguns autores. Segundo REID *et al.* (2003) e SANDERS (2003) a cepa de *S. thermophilus* libera lactase no intestino delgado. Os autores caracterizaram essa função como probiótica, apesar de enfatizarem que tal cepa não sobrevive à passagem pelo trato gastrointestinal e não possui origem na microbiota intestinal humana sadia. Entretanto, pesquisas realizadas com animais (DROUAULT *et al.*, 2002) e humanos (MATER *et al.* 2005) revelaram que *S. thermophilus* era capaz de sobreviver ao trânsito intestinal, podendo, dessa forma, ser considerada uma cepa probiótica.

Tabela 6. Populações de *Streptococcus thermophilus* (média e variação) obtidas para os queijos T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L.acidophilus*) T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g)								
Queijos								
	T1		T2		T3		T4	
Dias	Média	Variação*	Média	Variação*	Média	Variação*	Média	Variação*
1	9,33 ^{Aa}	9,08 – 9,65	9,61 ^{Aa}	9,12 – 9,94	9,20 ^{Aa}	9,05 – 9,32	9,51 ^{Aa}	9,15 – 9,97
7	9,27 ^{Aa}	9,16 – 9,44	9,52 ^{Aa}	9,17 – 9,75	9,40 ^{Aa}	9,09 – 9,60	9,45 ^{Aa}	9,15- 9,71
14	9,49 ^{Aa}	9,11 – 9,81	9,49 ^{Aa}	9,12 – 9,73	9,46 ^{Aa}	9,15 – 9,68	9,44 ^{Aa}	9,15 – 9,71
21	9,45 ^{Aa}	9,04 – 9,73	9,48 ^{Aa}	9,00 – 9,79	9,35 ^{Aa}	9,08 – 9,47	9,54 ^{Aa}	9,17 – 9,81
28	9,23 ^{Aa}	9,04 – 9,36	9,46 ^{Aa}	9,16 – 9,74	9,44 ^{Aa}	9,11 – 9,57	9,49 ^{Aa}	9,08 – 9,70

*Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

^A: letra maiúscula sobrescrita igual na mesma linha indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes queijos no mesmo período, de acordo com o Teste de Tukey.

^a: letra minúscula sobrescrita igual na mesma coluna indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para o mesmo queijo, de acordo com o Teste de Tukey.

4.3.4 Microrganismos indicadores de contaminação - coliformes totais, *Escherichia coli*, bolores e leveduras.

A Tabela 7 apresenta os valores das populações de coliformes totais para os quatros tipos de queijos estudados.

Foi detectada presença de coliformes totais em todos os queijos estudados

no primeiro dia de análise (1 dia após a produção). Entretanto, tais populações foram diminuindo ao longo do armazenamento refrigerado. O queijo T4 apresentou as menores populações de coliformes totais durante o armazenamento refrigerado dos produtos. Possivelmente, tal resultado pode ter sido em decorrência da presença simultânea das culturas de *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* que liberam ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, compostos alcoólicos, diacetil e bacteriocinas que combatem a proliferação desses microrganismos contaminantes (DILLON & COOK, 1994; ISEPON & OLIVEIRA, 1995; MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997; SAAD *et al.*, 2001). Semelhantemente, BURITI *et al.* (2007a) relataram inibição de contaminantes em queijo fresco cremoso na presença de *L. paracasei* em co-cultura com *S. thermophilus*, efeito este não observado pelos autores quando essas culturas estavam presentes individualmente no produto.

ARAGON-ALEGRO *et al.* (2007) monitoraram a evolução das populações de coliformes totais e *E. coli* em musse de chocolate adicionado de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e não observaram populações desses contaminantes durante 28 dias de armazenamento a 5°C. VEIGA *et al.* (2000) analisaram produtos comerciais e observaram populações inferiores a 10³ UFC/g quando os produtos foram armazenados em temperaturas variando entre 30°C e 45°C.

A legislação brasileira vigente estabelece que queijos de alta umidade apresentem populações máximas de até 10³ UFC/g para coliformes a 45°C (BRASIL, 1996).

Todos os queijos estudados apresentaram populações de coliformes totais abaixo do máximo estabelecido pela legislação brasileira vigente. Adicionalmente,

em nenhum dos queijos estudados foi detectada a presença de *E. coli*.

Na Tabela 8 estão representados os valores das populações de bolores e leveduras observadas para todos os queijos estudados.

Todos os queijos apresentaram populações de bolores e leveduras durante o armazenamento refrigerado. O queijo T4 apresentou populações de bolores e leveduras somente a partir do 14^o dia de armazenamento, já nos queijos controle, T2 e T3 foram detectadas populações já ao 7^o dia de armazenamento.

A legislação brasileira vigente estabelece, para queijos de alta umidade, limites máximos de populações de até 3,7 log UFC/g para bolores e leveduras (BRASIL, 1996). Durante os 28 dias de armazenamento, todos os queijos analisados não apresentaram populações desses contaminantes que ultrapassassem tal valor. Sendo assim, todos os queijos estudados atenderam o estabelecido pela legislação brasileira.

VEIGA *et al.* (2000) encontraram valores inferiores a 2,71 log UFC/g em amostras comerciais de queijo *petit-suisse* sabor morango. MORGADO & BRANDÃO (1998) relataram que o controle de bolores e leveduras é crítico para a manutenção da qualidade do *petit-suisse* por até um mês e que a indústria possui padrões mínimos para o queijo *petit-suisse*, nos quais as populações de bolores e leveduras devem ser inferiores a 3,3 log UFC/g para o produto recém fabricado. Entretanto, deve ser ressaltado que os queijos *petit-suisse* comerciais normalmente são adicionados de conservante (normalmente sorbato de potássio), o que não ocorreu nos queijos estudados no presente trabalho.

Tabela 7. Populações de coliformes totais obtidas para os queijos T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), durante o armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Populações de coliformes totais (log UFC/g)								
Queijos								
	T1		T2		T3		T4	
Dias	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**
1	2,29	1-2,74	2,43	<1-2,79	2,49	2,07-2,68	1,06	<1-1,60
7	1,80	<1-2,30	1,93	<1-2,50	2,18	1,30-2,41	<1	–
14	1,60	<1-2,07	0,69	<1-1,30	1,91	<1-2,39	<1	–
21	1,42	<1-1,90	<1	–	1,56	<1-2,07	<1	–
28	1,39	<1-1,69	<1	–	1,54	<1-2,07	<1	–

*Média das amostras positivas.

**Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

- = sem variação.

Tabela 8. Populações de bolores e leveduras obtidas para os queijos T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), durante o armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Populações de bolores e leveduras (log UFC/g)								
Queijos								
	T1		T2		T3		T4	
Dias	Média	Variação**	Média	Variação*	Média	Variação*	Média	Variação*
1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
7	2,22	2,00-2,90	1,56	1,00-2,80	1,70	1,00-2,95	<1	<1
14	3,12	3,00-3,42	3,00	3,00-3,20	2,53	2,00-3,32	2,52	2,00-3,30
21	3,22	3,00-3,50	3,06	3,00-3,27	3,10	3,00-3,45	3,00	3,00-3,29
28	3,42	3,00-3,60	3,15	3,00-3,47	3,22	3,00-3,50	3,05	3,00-3,25

*Média das amostras positivas.

**Valores mínimos – máximos das contagens obtidas para todas as amostras analisadas.

- = sem variação.

4.4 Textura Instrumental

Neste trabalho, foram analisados os perfis instrumentais de textura de amostras em cada período de armazenamento da última produção dos queijos *petit-suisse* estudados. Foram avaliados os parâmetros dureza, coesividade, elasticidade, adesividade e gomosidade. FOX *et al.* (2000) divide esses parâmetros de textura instrumentais em propriedades primárias (4 primeiros) e propriedades secundárias (último). Foram feitas 7 repetições de cada queijo para cada dia de análise.

A reologia envolve o estudo da deformação e fluxo de materiais quando

submetidos a uma tensão ou compressão (FOX *et al.*, 2000). Os testes oscilatórios dinâmicos (não destrutivos) são mais eficazes que técnicas reológicas destrutivas para medir as propriedades reológicas de queijos ácidos (OZER *et al.*, 1998). Assim sendo, medidas reológicas são particularmente adequadas para investigar a estrutura do queijo e estão intimamente relacionadas com a composição e o valor de pH (GONZALEZ *et al.*, 1998). Entre os principais objetivos para estudos de textura e propriedades reológicas dos queijos, destacam-se o estudo de sua estrutura e a procura por medidas físicas ideais, medidas estas que podem ajudar o fabricante no momento da fabricação de um produto de boa da qualidade (PRENTICE *et al.*, 1993).

Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, com a função de simular a mastigação entre os molares. A amostra é submetida a duas “mordidas” ou corridas, que simulam o ato de mastigação. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força - compressão é traçada. A partir dessa curva, obtêm-se os parâmetros primários - dureza, adesividade, coesividade, elasticidade e secundários - mastigabilidade e gomosidade, que compõem as características mecânicas dos queijos (FOX *et al.*, 2000).

A Figura 1 mostra a curva típica de análise do perfil de textura, obtida através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems), a partir da análise de amostras de queijo *petit-suisse* em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems).

Figura 3. Gráfico de análise do perfil de textura de queijo *petit-suisse*.

Dureza = força atingida em H; Coesividade = razão entre as áreas A_2 e

A_1 ; Adesividade = Trabalho em A_3 ; Elasticidade = razão entre t_2 e t_1 ;

Gomosidade = força em H x A_2/A_1 .

A Tabela 10 apresenta os dados de textura instrumental, obtidos para os parâmetros dureza, adesividade (valores em módulo), coesividade, elasticidade e gomosidade para os queijos *petit-suisse* T1, T2, T3 e T4.

A dureza é definida como a força necessária para provocar uma deformação no produto (SZCZESNIAK, 2002). A estabilidade da dureza durante o período de armazenamento é esperada uma vez que, dessa forma, confirma-se que o produto após algumas semanas de armazenamento continua semelhante ao

produto recém-fabricado. A estabilidade é desejada para manter as características físico-químicas e, conseqüentemente, sensoriais, do início ao fim da vida de prateleira do produto (MARUYAMA *et al.*, 2006). Entretanto, CARDARELLI & SAAD (2003) observaram parâmetros de textura não estáveis durante a vida de prateleira do queijo *petit-suisse*.

No presente trabalho, todos os queijos apresentaram queda na dureza durante os 28 dias de armazenamento. Os queijos T1, T3 e T4 apresentaram 3 diminuições significativas ao longo do período de armazenamento estudado ($p < 0,05$), sendo que a maior diminuição foi observada para o queijo T1 (tabela 9). Já o queijo T2 permaneceu mais estável durante os 28 dias de armazenamento, tendo apresentado queda significativa na dureza apenas na primeira semana de armazenamento ($p < 0,05$). Maruyama *et al.* (2006) estudaram diferentes combinações de gomas em queijo *petit-suisse* e observaram um aumento de dureza para 2 das 3 combinações de gomas testadas durante o armazenamento. Para a formulação contendo a mesma combinação de gomas utilizada e justamente, por esse motivo, selecionada para a realização do presente trabalho, a dureza manteve-se constante ao longo do armazenamento. Apesar de mantidas as mesmas proporções entre as diferentes gomas, essa diferença pode ter ocorrido em virtude das diferentes marcas de gomas utilizadas por Maruyama *et al.* (2006). Os pesquisadores utilizaram goma xantana Rhodigel 80 (Rhodia, França) e goma Carragena Texture FG 100T (Avebe do Brasil Ltda, Brasil), enquanto que, no presente trabalho, utilizou-se gomas xantana Grinsted 80 (Danisco, Brasil) e goma Carragena CY-500 (Danisco, Brasil).

Foi observada diferença significativa na dureza dos diferentes queijos estudados ($p < 0,05$) a partir do 7º dia de armazenamento para todos os queijos. No produto final (1 dia), somente o queijo T3 diferiu significativamente dos outros queijos ($p < 0,05$), sendo que os queijos T2 e T4, ambos suplementados com *L. acidophilus*, apresentaram os maiores valores de dureza ao longo do armazenamento (tabela 9). O queijo T1, elaborado apenas com a adição da cultura *starter*, apresentou valores de dureza significativamente inferiores aos queijos T2 e T4 já a partir da primeira semana de armazenamento e que o queijo T3 a partir de 21 dias ($p < 0,05$).

Em estudos com queijos minas frescal adicionados de culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, ambos adicionados de ácido láctico, realizados, respectivamente, por BURITI *et al.* (2005b) e BURITI *et al.* (2005a), foi observada diminuição na umidade ao longo do armazenamento refrigerado e aumento na dureza. No presente trabalho, por outro lado, em virtude da manutenção de uma mistura estável, como conseqüência da interação das gomas com os demais ingredientes do produto, aliada à embalagem bem vedada, a umidade de produto se manteve ao longo do seu armazenamento.

Por outro lado, o comportamento da dureza dos queijos minas frescal suplementados com cultura O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) nos trabalhos de BURITI *et al.* (2005b) e BURITI *et al.* (2005a) foi bastante semelhante ao comportamento da dureza nos queijos *petit-suisse* estudados no presente trabalho.

No presente trabalho foram obtidos elevados coeficientes de correlação entre os valores de pH e os valores de dureza para todos os queijos produzidos

(Tabela 9). Esse fato confirmou a tendência geral observada de diminuição acentuada de pH ao longo do armazenamento, acompanhada de uma diminuição de dureza, com perfis muito próximos entre si. Essa tendência foi, entretanto, menos acentuada para T2.

Todos os queijos apresentaram valores de correlação entre pH e dureza próximos de 1 sendo que o queijo T1 apresentou valor de correlação de 0,93, o queijo T2 de 0,92, o queijo T3 de 0,94 e o queijo T4 de 0,99. Foi observada também uma regressão significativa (valores de R-quadrado), sendo que o queijo T4 apresentou o maior valor (0,98), assim como para os valores da correlação, para um nível de significância de $p < 0,05$. O queijo T2 apresentou os menores valores de R-múltiplo e de R-quadrado, evidenciando a tendência menos acentuada da diminuição dos valores de pH e da dureza observados durante os 28 dias de armazenamento.

Essa relação pode também ter sido influenciada pelo ponto isoelétrico da caseína ($\pm$ pH 4,6), já que todos 4 queijos produzidos apresentaram valores de pH próximos desse ponto durante os 28 dias de armazenamento. Além disso, a hidrólise e a hidratação da caseína também podem ter contribuído para a desintegração da matriz protéica, o que resultaria na diminuição da dureza com o tempo de armazenamento (FOX *et al.*, 2000). Dessa forma os valores de dureza observados acompanharam a redução do pH durante os 28 dias de armazenamento, comprovando a alta correlação existente entre esses dois parâmetros.

Tabela 9: Valores dos coeficientes das correlações entre os valores de pH e dureza dos queijos *petit-suisse* T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), após 28 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Coeficientes das correlações	Queijos			
	T1	T2	T3	T4
r-múltiplo	0,93	0,92	0,94	0,99
R-quadrado	0,82	0,80	0,85	0,98

A adesividade é a força necessária para superar as forças existentes entre a superfície do alimento e a superfície de outros materiais que venham entrar em contato com o alimento (SZCZESNIAK, 2002). Os valores de adesividade dos queijos *petit-suisse* estudados diminuíram ao longo do armazenamento de 28 dias e foram observadas diferenças significativas a partir do produto final (1 dia) entre os queijos estudados (tabela 9). Os queijos controle (T1) e T2, com 2 variações significativas na adesividade ao longo do armazenamento, foram aqueles a apresentarem os menores valores de adesividade. Por outro lado, o queijo suplementado com ambas as culturas probióticas - T4 apresentou maiores valores de adesividade, tendo revelado, em conjunto com o T3, maior estabilidade durante os 28 dias de armazenamento, com apenas uma variação significativa no período.

A elasticidade é definida como o grau de recuperação da deformação causada a um pedaço de queijo depois que a força de deformação é removida (FOX *et al.*, 2000). Todos os queijos estudados permaneceram com valores de elasticidade muito próximos ao controle, sem variações significativas ($p>0,05$) durante toda a vida de prateleira dos produtos (tabela 9).

A coesividade é definida como a extensão com que um queijo pode ser

deformado até que haja ruptura na sua estrutura (FOX *et al.*, 2000). Os valores de coesividade dos queijos *petit-suisse* estudados mantiveram-se relativamente estáveis e, semelhantemente ao que ocorreu quanto a adesividade, sem diferenças significativas entre eles e ao longo de seu armazenamento ($p>0,05$), particularmente para T3 (tabela 9). Os queijos T2, T3 e T4 apresentaram resultados próximos entre si. Em contrapartida, o queijo T1, adicionado somente da cultura *starter*, apresentou os maiores valores após 21 dias de armazenamento.

A gomosidade é definida como a energia necessária para desintegrar um pedaço de queijo, tornando-o apto a ser deglutido (FOX *et al.*, 2000). Os queijos T1, T3 e T4 apresentaram diminuição nos valores desse parâmetro durante os 28 dias de armazenamento (tabela 9). Houve uma diferença significativa entre os queijos a partir do 7º dia, sendo que o queijo T2 permaneceu mais estável ao longo dos 28 dias de armazenamento, sem nenhuma variação significativa, enquanto os demais apresentaram 2 variações significativas no período ($p<0,5$). Sendo a gomosidade um parâmetro de textura derivado da dureza, a diminuição da gomosidade ao longo do armazenamento dos queijos acompanhou a diminuição da sua dureza.

Tabela 10. Perfil de textura instrumental (média e desvio padrão) dos queijos *petit-suisse* T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* +), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), no produto final (1 dia) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4±1°C.

Queijo	Dia	Dureza (gf)	Adesividade (gfs) **	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade (gf)
T1	1	75,03 ^{Aa} (2,25)	53,21 ^{Ca} (2,74)	0,82 ^{Aa} (0,02)	0,40 ^{Aa} (0,01)	28,44 ^{Aa} (1,83)
	7	54,59 ^{Bb} (1,73)	41,07 ^{Bb} (3,12)	0,81 ^{Aa} (0,02)	0,43 ^{Aa} (0,01)	23,26 ^{Bb} (0,47)
	14	48,52 ^{Cc} (1,63)	31,82 ^{Bb} (1,29)	0,83 ^{Aa} (0,02)	0,44 ^{Aa} (0,01)	21,55 ^{Bb} (0,54)
	21	35,40 ^{Cd} (3,89)	27,33 ^{Cc} (3,08)	0,82 ^{Aa} (0,03)	0,54 ^{Aa} (0,03)	17,31 ^{Cc} (1,82)
	28	33,06 ^{Dd} (1,15)	25,11 ^{Cc} (3,12)	0,86 ^{Aa} (0,02)	0,50 ^{Aa} (0,08)	17,69 ^{Bc} (0,50)
T2	1	67,06 ^{Aa} (2,60)	50,62 ^{Ca} (3,18)	0,88 ^{Aa} (0,03)	0,43 ^{Aa} (0,10)	26,05 ^{Aa} (0,52)
	7	63,90 ^{Ab} (1,37)	31,41 ^{Cb} (2,64)	0,83 ^{Aa} (0,04)	0,46 ^{Aa} (0,17)	24,94 ^{Ba} (0,87)
	14	62,41 ^{Ab} (1,97)	29,13 ^{Bb} (3,22)	0,82 ^{Aa} (0,02)	0,39 ^{Aa} (0,01)	24,58 ^{Aa} (1,03)
	21	62,12 ^{Ab} (1,67)	29,93 ^{Cb} (2,86)	0,81 ^{Aa} (0,01)	0,40 ^{Aa} (0,01)	24,38 ^{Aa} (0,48)
	28	61,09 ^{Ab} (1,05)	26,07 ^{Cc} (1,41)	0,83 ^{Aa} (0,02)	0,39 ^{Aa} (0,01)	25,41 ^{Aa} (0,95)
T3	1	58,22 ^{Ba} (3,16)	68,79 ^{Ba} (5,55)	0,85 ^{Aa} (0,01)	0,42 ^{Aa} (0,01)	24,52 ^{Aa} (1,28)
	7	50,45 ^{Cb} (1,74)	45,04 ^{Bb} (4,72)	0,82 ^{Aa} (0,02)	0,44 ^{Aa} (0,01)	21,94 ^{Bb} (0,31)
	14	49,06 ^{Cb} (1,68)	44,07 ^{Bb} (4,29)	0,82 ^{Aa} (0,02)	0,44 ^{Aa} (0,01)	21,48 ^{Bb} (0,68)
	21	46,60 ^{Bc} (1,29)	41,04 ^{Bb} (2,22)	0,81 ^{Aa} (0,03)	0,44 ^{Aa} (0,01)	20,32 ^{Bbc} (0,66)
	28	43,62 ^{Cd} (3,05)	40,01 ^{Bb} (2,41)	0,83 ^{Aa} (0,03)	0,42 ^{Aa} (0,01)	18,40 ^{Bc} (1,27)
T4	1	72,36 ^{Aa} (4,14)	73,44 ^{Aa} (1,48)	0,83 ^{Aa} (0,02)	0,40 ^{Aa} (0,01)	28,65 ^{Aa} (1,39)
	7	62,00 ^{Ab} (2,20)	71,43 ^{Aa} (2,14)	0,84 ^{Aa} (0,01)	0,43 ^{Aa} (0,01)	26,41 ^{Ab} (0,95)
	14	55,02 ^{Bc} (4,41)	63,84 ^{Ab} (3,85)	0,84 ^{Aa} (0,02)	0,43 ^{Aa} (0,01)	24,41 ^{Ac} (2,00)
	21	49,49 ^{Bd} (4,90)	63,42 ^{Ab} (2,46)	0,85 ^{Aa} (0,01)	0,45 ^{Aa} (0,01)	22,80 ^{Ac} (2,27)
	28	49,08 ^{Bd} (3,39)	63,97 ^{Ab} (2,69)	0,85 ^{Aa} (0,06)	0,41 ^{Aa} (0,02)	20,86 ^{Bc} (1,03)

** valores em módulo

A,B,C,D: letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes queijos estudados para o mesmo período de armazenamento de acordo com o Teste de Tukey.

a,b,c,d: letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os diferentes dias de armazenamento para o mesmo queijo, de acordo com o Teste de Tukey.

4.5 Análise Sensorial

Conforme mencionado em “Material e Métodos”, a análise sensorial das amostras de queijo *petit-suisse* foi realizada após 7 e 14 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$. A referida análise foi conduzida com 35 provadores não treinados (consumidores), de ambos os sexos em cada etapa da análise. Os provadores foram instruídos a avaliar os queijos quanto ao sabor, textura e aceitabilidade global, utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = não gostei e nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) (LAWLESS & HEYMANN, 1999), a tabela 10 apresenta os valores da análise sensorial

O queijo T4, elaborado com as duas culturas probióticas em co-cultura com a cultura *starter*, sempre apresentou as maiores médias (entre 6,2 e 7,3) para os atributos testados durante os dias de análise, em comparação à média dos demais queijos, que permaneceram entre 4,8 e 6,6.

Houve diferença entre os queijos estudados para o atributo sabor, sendo que o queijo *petit-suisse* T4 apresentou a maior aceitabilidade ao 7º e ao 14º dia de armazenamento. O queijo T4 diferiu dos demais queijos nos 3 atributos avaliados, sempre com notas superiores, ao 7º dia de armazenamento refrigerado ($p<0,05$). Ao 14º dia de armazenamento, somente o queijo T3 diferiu dos demais ($p<0,05$), apresentando as menores médias quanto aos atributos sabor e textura, quando comparados aos demais queijos. O referido queijo apresentou as menores médias que o queijo T4 quanto a todos os atributos sensoriais avaliados, tanto após 7 quanto após 14 dias ($p<0,05$).

Com relação à textura, ao 7º dia de análise, somente o queijo T4 diferiu dos

demais, recebendo as melhores notas dos provadores ($p < 0,05$). Ao 14º dia de análise os queijos T2 e T4 receberam as melhores notas e os provadores enfatizaram a “consistência” desses queijos como o atributo que eles mais apreciaram no teste. Este fato coincidiu com os queijos que apresentaram os maiores valores de dureza ao 7º e 14º dias de análise da textura instrumental. Assim sendo, possivelmente essa característica influenciou as notas dos provadores durante os dois dias de análise sensorial.

A aceitabilidade global foi o último atributo avaliado na análise sensorial. Ao 7º e 14º dia de armazenamento, novamente o queijo T4 apresentou a maior média entre os queijos avaliados. Tal fato era esperado, já que esse queijo recebeu as maiores notas para os atributos sabor e textura. Resultados opostos foram obtidos por FAVARO-TRINDADE *et al.* (2006), que produziram sorvete probiótico sabor acerola adicionado da cepa potencialmente probiótica de *B. lactis* e a cultura *starter S. thermophilus*. O produto com pH 4,5 foi melhor aceito em um teste com escala hedônica, quando comparado ao sorvete com pH 5,0.

VEIGA & VIOTTO (2000) fabricaram queijo *petit-suisse* por ultrafiltração e também analisaram o produto comercial, aplicando um teste de aceitabilidade para avaliar a aceitabilidade global, consistência, aparência e sabor. As pesquisadoras obtiveram notas para seus produtos por parte dos provadores que variaram na escala entre “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

MORGADO & BRANDÃO (1998) desenvolveram queijo *petit-suisse* por ultrafiltração e realizaram teste de aceitação em escolas de segundo grau, empregando escala hedônica. A avaliação por parte dos provadores permaneceu entre “gostei muitíssimo” e “gostei moderadamente”. Tal resultado foi superior aos

resultados obtidos na avaliação sensorial realizada no presente trabalho. Entretanto, demonstraram que o queijo *petit-suisse* é um produto bastante apreciado e seu baixo consumo no Brasil pode ser devido aos altos custos de fabricação, preço final do produto e o marketing dirigido somente ao público infantil.

HEKMAT & REID (2006) produziram um iogurte com as cepas probióticas de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* e compararam esse produto a um iogurte do mercado, através de um teste de aceitação de escala hedônica. Os pesquisadores obtiveram notas que variaram na escala entre 7 (gostei moderadamente) e 8 (gostei muito) para os atributos sabor, textura, aparência e aceitabilidade global. Tais resultados foram superiores aos resultados observados no presente trabalho.

SOUZA *et al.* (*no prelo*) produziram queijo minas frescal com adição de *L. acidophilus* ou em co-cultura com *S. thermophilus*, e compararam com o queijo minas controle sem adição de culturas, através do teste de escala hedônica estruturada e observaram que o queijo probiótico apresentou aceitabilidade mais elevada após 7^o e o 14^o dia de armazenamento em comparação ao queijo controle. Quanto para sobremesa com base láctea suplementado com probióticos, ARAGON-ALEGRO *et al.* (2007) relataram que a adição de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 não interferiu no teste sensorial de musse de chocolate. CORRÊA *et al.* (*no prelo*) estudaram o efeito das culturas *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* na aceitabilidade sensorial de manjar branco durante o armazenamento a 5°C. Todos os produtos foram bem aceitos e não diferiram significativamente ($p>0,05$), após 7, 14 e 21 dias de armazenamento. Entretanto,

se no presente trabalho a adição de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em co-cultura melhoraram a aceitabilidade sensorial do *petit-suisse* probiótico, os autores reportaram que houve uma tendência na redução das notas quando ambos os microrganismos estavam presente na formulação do manjar branco.

Tabela 11. Médias de aceitação na análise sensorial para os atributos sabor, textura e aceitabilidade global dos queijos *petit-suisse* T1 (*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), após 7 e 14 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Atributo	Dias	Queijos				DMS*
		T1	T2	T3	T4	
Sabor	7	6,2 ^{Ba}	6,6 ^{Ba}	6,4 ^{Ba}	7,3 ^{Aa}	0,7
	14	6,3 ^{Aa}	6,1 ^{Aa}	5,9 ^{Ba}	6,6 ^{Aa}	0,7
Textura	7	4,8 ^{Bb}	5,2 ^{Ba}	5,3 ^{Ba}	6,2 ^{Aa}	0,7
	14	5,9 ^{Ba}	5,9 ^{Ba}	5,1 ^{Ca}	6,8 ^{Aa}	0,8
Aceitabilidade global	7	5,8 ^{Ba}	5,9 ^{Ba}	5,8 ^{Ba}	6,8 ^{Aa}	0,7
	14	6,0 ^{Ba}	6,1 ^{ABa}	5,6 ^{Ba}	6,6 ^{Aa}	0,6

^{A,B,C}: Letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes queijos para um mesmo período, de acordo com o Teste de Tukey.

^{a,b}: Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os diferentes dias de análise para cada queijo estudado, de acordo com o Teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

No sentido de possibilitar uma visualização global dos diferentes resultados obtidos no presente trabalho, a Figura 4 reúne os perfis de pH, umidade, dureza, aceitabilidade global e de comportamento das populações de *S. thermophilus* e dos probióticos *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, para os queijos *petit-suisse* estudados.

Foi observada uma tendência geral de diminuição acentuada de pH ao longo do armazenamento, com perfis muito próximos entre si. Essa tendência de diminuição de pH foi acompanhada de uma diminuição de dureza, a qual foi menos acentuada para T2.

Para T3 e T4, ao contrário de T1 e T2, essas tendências resultaram em uma tendência de redução de notas de aceitabilidade global por parte dos provadores.

Com relação às populações dos probióticos e da cultura *starter*, ambas permaneceram relativamente estáveis durante os 28 dias de armazenamento, com populações acima de 7 log UFC/g e 9 log UFC/g, respectivamente. O mesmo comportamento de estabilidade foi observado para os valores de umidade durante os 28 dias de armazenamento.

Figura 4. Perfil de pH (a), umidade (b), dureza (c), aceitabilidade global (d) e populações de *S. thermophilus* (e) e dos probióticos *L. acidophilus* (La) e *B. animalis* subsp. *lactis* (Bl) (f), para os queijos *petit-suisse*: T1 (controle-*S. thermophilus*), T2 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus*), T3 (*S. thermophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*) e T4 (*S. thermophilus* + *L. acidophilus* + *B. animalis* subsp. *lactis*), ao longo do armazenamento refrigerado a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 28 dias.

Os resultados apresentados anteriormente podem ser assim resumidos:

- Todos os queijos *petit-suisse* estudados apresentaram populações de *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* acima do nível mínimo recomendado para um alimento probiótico durante os 28 dias de armazenamento refrigerado. As populações desses microrganismos variaram de 7,00 a 7,96 log UFC/g (*L. acidophilus*), de 8,02 a 8,96 log UFC/g (*B. animalis* subsp. *lactis*) e de 9,04 a 9,97 log UFC/g (*S. thermophilus*) ao longo do armazenamento dos queijos.
- As populações dos microrganismos contaminantes observadas permaneceram abaixo do máximo estabelecido pela legislação brasileira vigente durante os 28 dias de armazenamento refrigerado.
- A dureza dos queijos diminuiu significativamente ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento refrigerado por até 28 dias, sendo que o queijo T2 apresentou-se mais estável.
- A análise sensorial mostrou que o produto suplementado com a bactéria probiótica de *L. acidophilus* La-5 e a bactéria potencialmente probiótica de *B. animalis* subsp. *lactis* BL04 em co-cultura resultou em benefícios sensoriais ao produto, uma vez que esse produto obteve as melhores notas e suas características sensoriais mantiveram-se estáveis durante o armazenamento refrigerado. Todos os queijos estudados apresentaram boa aceitabilidade.

5. Conclusão

- O presente trabalho mostrou que a suplementação de queijo *petit-suisse* produzido com a cultura *starter S. thermophilus*, com a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e com a cultura potencialmente probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* conferiu excelente perspectiva como um produto funcional quando as culturas eram adicionadas em co-cultura, devido o aumento simultâneo da viabilidade probiótica durante o armazenamento e também da excelente aceitação sensorial. A boa aceitação do queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico demonstrou um potencial para o alcance de consumidores adultos que poderia ser explorado por fabricantes de queijo *petit-suisse*, com a adição de cepas probióticas e suas propriedades funcionais.

6. Referências bibliográficas¹

ACNIELSEN, do Brasil. Pesquisa de mercado sobre o queijo *petit-suisse* de 14 de maio de 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Recomendações da Comissão Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em: 20 dez. 2001a.

¹As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 18 jan. 2005.
- AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viabilidade e atividade das bifidobactérias em iogurte contendo frutooligossacarídeos durante o armazenamento refrigerado. **International Journal of Food Science Technology**, v.39, p.61-621, 2004.
- ALEGRO, J.H.A. **Desenvolvimento de queijo minas frescal probiótico com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. São Paulo, 2003. 84p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo
- ALEGRO, J.H.A.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura de queijos Minas frescal contendo *L. acidophilus* e *B. lactis* isolados ou em co-cultura. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, supl.1, p.61, 2002b. Res.ALN41. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, 2007.
- ANDERSSON H, A.S.P, BRUCE A, ROOS S, WADSTROM T, WOLD A.E. Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v.45, p.58-75, 2001.
- ARUNACHALAM, K. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Reviews**, v.19, n.10, p.1559-1597, 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimento sob inspeção federal. São Paulo, 2005.
- BADIS, A.; GUETARINI, D.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; HENNI, D.E.; TORNADIJO, M.E; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian

- raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v.2, n.3, p.343-349, 2004.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: UNICAMP, p.401, 2003.
- BERNET-CAMARD, M.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J.; SERVIN, A.L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance (s) active *in vitro* and *in vivo*. **Applied and Environment Microbiology**, v.63, n.7, p.2747-2753, 1997.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.
- BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.8-15, 1996
- BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into chesses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p. 375-387, 2004.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº146, de 7 de março de 1996, DIPOA, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Diário Oficial, Brasília, 11mar. 1996. Regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijo petit-suisse. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sdal>. Acesso em 15 de maio de 2002.
- BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2.
- BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo petit-suisse. IN: LERAYER, A L.S., ed. Nova legislação de produtos lácteos. **Revista Indústria de Laticínios**: São Paulo, 2002.
- BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and

- synbiotic fresh cream-cheeses. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.228-235, 2007a.
- BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1605-1610, 2007b.
- BURITI, F.C.A.; OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v.57, n.2, p.179-185, 2007.
- BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173-180, 2005a.
- BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, p.1279-1288, 2005b.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, p.225, 2003.
- CANGANELLA, F., GIONTELLA, D., NESPILLA, M.L., MASSA, S., TROVATELLI, L.D. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* in yogurts manufactured from cowmilk and soymilk during storage at two temperatures. **Annals of Microbiology**, v.50, p.43-53, 2000.
- CARDARELLI, H.R. *Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico*. São Paulo, 2006. 133p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT – Food Science and Technology** [no prelo].
- CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Avaliação microbiológica de diferentes formulações de queijo *petit-suisse* probiótico durante o armazenamento refrigerado. In:

- SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 5, Campinas, 2003. Resumos. Campinas. UNICAMP, 2003. 1 CD.
- CARMINATI, D.; PERRONE, A.; NEVIANI, E. Inhibition of *Clostridium sporogenes* growth in mascarpone cheese by co-inoculation with *Streptococcus thermophilus* under conditions of temperature abuse. **Food Microbiology**, v.18, p.571-579, 2001.
- COCONNIER, M.H.; SERVIN, A.L. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v.17, n.5, p.741-754, 2003.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.
- CORRÊA, S.B.M., CASTRO, I.A., & SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, [no prelo].
- DATAMARK, Marketing enriquecido ajuda danoninho a aumentar venda, disponível em: http://www.justi2inews.com/Conteudo/Justi2i_News_Conteudo_P.aspx?IDN=20383 acesso dia 11 de maio de 2007.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2804-2816, 1998.
- DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.
- DE VUYST, L., and E. J. VANDAMME. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. L. De VUYST and E. J. VANDAMME, eds. **Blackie Academic and Professional**, p. 91-142, Glasgow, UK, 1994.
- DILLON, V.M.; COOK, P.E. Biocontrol of undesirable microorganisms in food. In: DILLON, V.M., BOARD, R.G., eds. **Natural antimicrobial systems and food preservation**. Wallingford: CAB International, p.255-296, 1994.
- DINAKAR, P., MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2854-2864, 1994.
- DROUAULT, S.; ANBA, J.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* is able to

produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. **Applied and Environment Microbiology**, v.68, n.2, p.938-941, 2002.

DU PLESSIS, E.M., DICKS, L.M.T., VESCOVO, M. TORRIANI, S., DELLAGLIO, F. *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review. **Annals of Microbiology Enzimology**, v.47, p.151-164, 1996.

FAVARO-TRINDADE, C.S., BERNARDI, S., BODINI, R.B., BALIEIRO, J.C.C., ALMEIDA, E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. **Journal of Food Science**, v.71, n.6, p.492-495, 2006.

FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.449-455, 2003.

FERREIRA, V.L.P,coord. **Análise sensorial**: testes discriminativos e afetivos. Campinas: PROFÍQUA/SBCTA. Manual: série qualidade, p.117, 2000.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v.17, n.5, p.711-724, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001.

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

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

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

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic

- strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.7, p.1379-1387, 1999.
- GILLILAND, S. E., and SPECK M. L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v.40, p.820-823, 1977.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.37-47, 1997.
- GOLDIN, B.R., Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.S203-S207, 1998.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.139-157, 1999.
- GOMES, A.M.P.; VIEIRA, M.M.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **Journal of Food Engineering**, v.36, p.281-301, 1998.
- GONCU, A.; ALPKENT, Z. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yogurt or a commercial cheese culture as a starter. **International Dairy Journal**, v.15, p.771-776, 2005.
- GONZÁLEZ, V.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura instrumental de queijo tipo minas frescal. **Revista Farmacêutica Bioquímica Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.34, n.2, p.109-113, 1998.
- HALSTED, C.H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77 (suppl): p.1001S–1007S, 2003.
- HEKMAT, S.; McMAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1415-1422, 1992.
- HEKMAT, S., REID, G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. **Nutrition Research**, v.26, p.163-166, 2006
- HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.;

- JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, p.99-131, 1999.
- HOLLINGSWORTH, P. Yogurt reinvents itself. **Food Technology**, v.55, n.3, p.43-49, 2001.
- HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; BERNARD DECARIS, B.; ALEXANDER BOLOTIN, A.; CHRISTINE DELORME, C.; EHRLICH, D.; GUÉDON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEERREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiological Reviews**, v.29, p.435-463, 2005.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365S-373S, 2001.
- HSU, C.A.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.197-206, 2005.
- HUSSON-KAO, C.; MENGAUD, J.; GRIPON, J.C.; BENBADIS, L.; CHAPOT-CHARTIER, M.P. Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.209-213, 2000.
- INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **Journal of Food Protection**, v.62, n.1, p.77-80, 1999.
- ISEPON, J. S., Oliveira A.J. Influência do emprego de culturas lácticas nas características do queijo tipo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, p.1-5, 1995.
- JAIN P.K.; MCNAUGHT, C.E.; ANDERSON, A.D.; MACFIE, J.; MITCHELL, C.J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on

gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial.

Clinical Nutrition, v.23, p.467-475, 2004.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods**: biochemical and processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing, p.357-381, 1998

JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.293-296, 2001.

KWAK, H.S.; AHN, J.J.; LEE, K.W.; SUH, D.S. Flavor and sensory attribute in yogurt fermentation. **Food Biotechnology**, v.5, n.2, p.94-98, 1996.

LAJOLO, F.M. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE ALIMENTOS FUNCIONAIS. ILSI, 1. **Anais**. São Paulo, 1999.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of foods**: principles and practices. Gaithersburg: Aspen, p.827, 1999.

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

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p. 241-245, 1995.

LEE, J.W.; SHIN, J.G.; KIM, E.H.; KANG, H.E.; YIM, I.B.; KIM, J.Y.; JOO, H.G.; WOO, H.J. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*. **Journal Veterinary Science**, v.5, p.41-48, 2004.

LIN, M.Y.; SAVAIANO, D.; HARLANDER, S. Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.87-95, 1991.

LIN, M.Y.; CHEN, S.H. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. **Digestive Diseases and Sciences**, v.43, p.133-137, 1998.

LOPES, C.G. Ciência do Leite. Alimentos funcionais. Disponível em: www.cienciadoleite.com.br/petitsuissecaseiro.htm, acessado dia 12 de abril de 2005.

- LOURENS-HATTING, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1-17, 2001.
- MARSHALL, R.T., ed. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, p.546, 1992.
- MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393, 2006.
- MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Avaliação sensorial de queijo *petit suisse* potencialmente probiótico adicionado de diferentes gomas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 13, Ribeirão Preto, 2005. **Resumos**. São Paulo: USP, 2005. 1CD.
- MATER, D.D.G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M.J.; MOGENET, A.; BRESSON, J.L.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruecki* subsp. *Bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiology Letters**, v.250, p.185-187, 2005
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGON, G. Gut immunomodulation by probiotic fresh chesse. **International Dairy Journal**, v.14, p.611-618, 2004.
- MITAL, B.K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hipcholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. **Critical Review Microbiological**, v.21, n.3, p.175-214, 1995.
- MODLER, H.W., Bifidogenic factors: sources metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v.4, n.5, p.383-407, 1994.
- MONTVILLE, T. J., WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria, **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. ASM Press, Washington, D.C, p.557-577, 1997.
- MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Ultrafiltração do leite para a produção de queijo tipo *petit-suisse*. **Indústria de Laticínios**, v.2, n.13, p.35-44, 1998.

- NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, p.431-462, 2000.
- NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.100, n.6, p.583-592, 2005.
- OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, texture properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.
- ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, n.5, p.446-456, 2006.
- OZER, B. H.; BELL, A. E.; GRANDISON, A. S. & ROBINSON, R. K. Rheological properties of concentrated yogurt (labneh). **Journal of Texture Studies**, v.29, n.1, p.67-79, 1998.
- PHILIPPI, S.T.; RODRIGUES, A.T.; COLUCCI, A.C.A. Pirâmide alimentar para crianças de 2 a 3 anos. **Nutrition Reviews**, v.16, n.1, p.5-19, 2003.
- PRENTICE, J.H.; LANGLEY, K.H.; MARSHALL, R.J. Cheese rheology. In: FOX, P.F., ed. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Chapman & Hall, v.1, p.303-340, 1993.
- PRIMO, W.M. Revista Laticínios._O que esperar em 2002, v.16, p.24-26, 2002
Disponível em:
www.revistalaticinios.com.br/main_frame/revista/ed_37/eco_merc/analise.htm,
acessado dia 12 de abril de 2005.
- PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO - ALIMENTOS FUNCIONAIS & BIOTECNOLOGIA. **Anais...** Campinas: ITAL, 2002.
- REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL,

- R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.37, n.2, p.105-118, 2003.
- ROSSI, E.A. Formulação de um sucedâneo do iogurte a base de soro de leite e extrato aquoso de soja. Londrina, 74p [Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual de Londrina], 1993.
- ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. **International Dairy Journal**, v.7, p.785-793, 1997.
- RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. **Australian Journal Dairy Technology**, v.50, n.2, p.51-57, 1995.
- RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. **In Compendium of the methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA 4th ed. p. 483-495, 2001.
- SAAD, M.I.S., VANZIN, C., OLIVEIRA, M.N., FRANCO, B.D.G.M. Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1151-1155, 2001.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.319-331, 2001.
- SAS (6.08): Statistical Analysis Institute. The SAS Institute, Cary, NC, 1992.
- SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.387-392, 1999.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus*

- and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v.7, p.349-356, 1997.
- SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acid production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p.127-131, 2000.
- SOUZA, C.H.B., BURITI, F.C.A., BEHRENS, J.H., SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a *thermophilic* starter culture. **International Journal of Food Science and Techonology**, [no prelo].
- SREEKUMAR, O.; HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.5, p. 931-939, 2000.
- SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, GW. Probiotics: a critical review Wymondham: **Horizon Scientific**, p.57-64, 1999.
- SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v.13, n.4, p.215-225, 2002.
- THAMER, K.G; BARRETTO PENNA, A.L. 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, p.393-400, 2005.
- VEIGA, P.G. Fabricação de queijo *petit-suisse* por ultrafiltração de leite coagulado. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, p.116, 1999.
- VEIGA, P.G.; CUNHA, R.L.; VIOTTO, W.K.; PETENATE, A.J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit-suisse brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.349-357, 2000.
- VEIGA, P.G.; VIOTTO, W.K. The influence of heat treatment on the composition water holding capacity and acceptance of *petit-suisse* cheese produced by the ultrafiltration of coagulated milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.83-90, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in

- Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v.33, p.97-102, 2000a.
- VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, p.579-589, 2002.
- VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.9, p.1905-1911, 2000b.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000c.
- WANG, K.Y.; LI, S.N.; LIU, C.S.; PERNG, D.S.; SU, Y.C.; WU, D.C.; JAN, C.M.; LAI, C.H.; WANG, T.N.; WANG, W.M. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.737-741, 2004.
- WANG, Y.C., YU, R.C., CHOU, C.C. Viability of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.209-217, 2004.
- YOUNG, R.J.; HUFFMAN, S. Probiotic use in children. **Journal Pediatric Health Care**, v.17, n.6, p.277-283, 2003.
- ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p.473-479, 1998.
- ZISU, B.; SHAH, N.P. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjuncts cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3405-3415, 2003.

Anexo 1. Preparação do ágar MRS-IM para *Lactobacillus acidophilus* (de acordo com Christian Hansen).

Tryptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Tween 80	1,0 g
Dipotássio hidrogenofosfato	2,6 g
Sódio acetato trihidrato	5,0 g
Di-amônio hidrogeno citrato	2,0 g
Magnésio sulfato heptahidrato	0,2 g
Manganês (II) sulfato monohidrato	0,05 g
Ágar bacteriológico	13,0 g

Suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada. Ferver o meio até dissolução total. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfriar a 47°C+1°C e adicionar 100 mL de solução de maltose a 20% estéril.

Anexo 2. Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**Ofício CEP nº 154/2005

São Paulo, 01 de novembro de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).**Lucas Campana Pereira****Orientador: Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT**

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de outubro de 2005, **APROVOU** o projeto "Influência da associação de culturas probióticas sobre as características de queijo tipo petit suisse" (Protocolo CEP nº 322) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Anexo 3. Ficha para teste de escala hedônica – Aceitabilidade geral.

Nome: _____ Data: ____/____/____

AMOSTRA: _____

Avalie a amostra e circule o número na escala abaixo que indique a sua opinião geral sobre o produto.

9 = gostei muitíssimo

8 = gostei muito

7 = gostei moderadamente

6 = gostei ligeiramente

5 = nem gostei nem desgostei

4 = desgostei ligeiramente

3 = desgostei moderadamente

2 = desgostei muito

1 = desgostei muitíssimo

Cite o atributo que você **mais** gostou na amostra: ☺Cite o atributo que você **menos** gostou na amostra: ☹

Comentários:

Anexo 4. Recrutamento de provadores para análise sensorial de alimentos.**Anexo 4.**

Estamos convidando você para participar de uma análise sensorial de queijo tipo “petit-suisse” probiótico.

Esta análise será conduzida pelo aluno de Mestrado Lucas Campana Pereira, sob orientação da Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da faculdade.

O produto a ser avaliado apresenta os seguintes ingredientes:

Leite desnatado, cloreto de cálcio, coalho, corante, aroma, creme de leite, açúcar, polpa de morango e gomas guar, carragena e xantana.

O produto foi elaborado e acondicionado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP.

Nessa análise o provador deverá provar 4 amostras de queijo tipo “petit-suisse” e assinalar o quanto gostou ou desgostou da amostra. O teste será conduzido no laboratório de Análise Sensorial do Bloco 16. Ao final das análises os provadores receberão um brinde, mas não haverá remuneração financeira. Todas as informações serão sigilosas, garantindo a privacidade do provador.

Portanto, se você quiser participar dessa análise, favor preencher as informações do Termo de Compromisso abaixo:

Estou ciente do objetivo do teste, não apresento reação alérgica ou intolerância aos ingredientes, e aceito participar dessa análise.