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

Desenvolvimento e caracterização de produto tipo patê de base
láctea potencialmente simbiótico

Cristina Dini Staliano

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2012

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

Desenvolvimento e caracterização de produto tipo patê de base
láctea potencialmente simbiótico

Cristina Dini Staliano

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Staliano, Cristina Dini
S783d Desenvolvimento e caracterização de produto tipo patê de base
 láctea potencialmente simbiótico / Cristina Dini Staliano. -- São
 Paulo, 2011.
 96p.

 Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
 Bioquímico-Farmacêutica.
 Orientador: Saad, Susana Marta Isay

 1. Tecnologia de alimentos 2. Microbiologia de alimentos
 3. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 4. Produtos
 lácteos I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.

664 CDD

Cristina Dini Staliano

Desenvolvimento e caracterização de produto tipo patê de base
láctea potencialmente simbiótico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad
orientadora/presidente

Prof.^a Dr.^a Cynthia Jurkiewicz Kunigk
1º examinadora

Dr.^a Raquel Bedani
2º examinadora

São Paulo, 09 de fevereiro de 2012.

*Este trabalho é fruto de grande força
de vontade e da busca incessante pelo
conhecimento. Com amor, dedico-o à minha
querida família, em especial aos meus pais,
Marli e João Paulo, e ao meu marido,
Eduardo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades lançadas em meu caminho e por estar, constantemente, ao meu lado, ajudando-me a superar todo e qualquer obstáculo.

Agradeço aos meus pais, Marli e João Paulo, que em todos os momentos, apoiaram a minha educação e ensinaram-me os melhores valores da vida.

Ao meu marido, Eduardo, por todo o amor, incentivo, carinho, respeito, dedicação e crença de que eu sou capaz de alcançar todos os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Paulo, pela amizade, carinho e incentivo.

À Prof.^a Dr.^a Susana, por me orientar, pelo conhecimento, amizade, dedicação e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Bernadette Franco, pela colaboração ao ceder a cepa de *Lactobacillus sakei* 2a utilizada neste trabalho.

Ao Rafael Martinez, pela amizade, apoio e colaboração constante.

À Martha Villarreal, pela amizade, alegria e colaboração.

À Cínthia Hoch, pela ajuda e disponibilidade no início das atividades do mestrado.

Aos meus companheiros de laboratório, Graziela, Natália, Raquel, Clara, Mayra, Diogo, Marina Padilha, Marina Campos, Carolina, Daniel, Regina e Bruno, pela amizade, agradável convivência e auxílio durante as análises sensoriais.

A todos os colegas de departamento, em especial, à Ana Lúcia e à Cristina, pela convivência.

Ao Alexandre Mariani, pela constante ajuda e disponibilidade na realização das análises e pelos momentos de descontração e alegria.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Mirian, Elza, Juarez, Nilton, Ivani e Gledson e à Kátia do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

À Leila Bonadio, pela correção das referências bibliográficas.

Aos secretários da pós-graduação, Jorge e Elaine, e aos funcionários da informática.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (nº processo: 2009/ 13347-3), à CAPES e ao CNPq.

Às empresas Laticínios Salute, Danisco e Orafti pela doação de parte dos ingredientes utilizados neste trabalho.

Aos amigos e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

STALIANO, C.D. **Desenvolvimento e caracterização de produto tipo patê de base láctea potencialmente simbiótico**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Uma notável tendência na área de alimentos é o desenvolvimento de produtos que agreguem sabor, praticidade, conveniência e tragam benefícios à saúde. Dentro desse cenário, encontram-se os alimentos funcionais, que têm sido alvos de pesquisas científicas para elucidar os benefícios que trazem ao homem. Os probióticos e prebióticos são os ingredientes fisiologicamente ativos que compõem o alimento e agem na manutenção do equilíbrio da microbiota do trato gastrointestinal humano. A combinação de probióticos e prebióticos resulta em um produto simbiótico. Com outro apelo de alimento funcional, pode-se citar o tomate, fruto que apresenta licopeno em sua composição, pigmento com potencial antioxidante e ação preventiva contra diversos tipos de câncer. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um produto tipo patê potencialmente simbiótico, à base de queijo quark, adicionado de derivados de tomate, manjerição e queijo parmesão, bem como avaliar as suas características físico-químicas, microbiológicas, de textura instrumental e sua aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial durante o seu armazenamento a 4 ± 1 °C por até 28 dias.

Foram produzidos três tratamentos do produto tipo patê (em triplicata), todos eles suplementados com inulina: T1 (controle) com a cultura *starter Streptococcus thermophilus* ST-M6; T2 com a cultura *starter* ST-M6 e a adição dos probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* NCFMe T3 com a cultura *starter* ST-M6, a cultura probiótica Bb-12 e a adição de *Lactobacillus sakei* 2a. Os produtos foram armazenados a 4 ± 1 °C e durante os períodos de armazenamento (1, 7, 14, 21 e 28 dias), foi analisada a viabilidade dos probióticos, da cultura *starter* e de *L. sakei* 2a, a fim de avaliar a possível adaptação desta cepa bacteriocinogênica ao meio lácteo, uma vez que foi isolada de linguiça frescal. Adicionalmente, o pH e o perfil de textura instrumental do produto (teste de dupla penetração de amostras em analisador de textura TA-XT2) foram analisados e, a partir de amostras mantidas congeladas no dia seguinte à sua fabricação, foi determinada a composição centesimal das diferentes formulações. Além disso, aos 7, 14 e 21 dias, as amostras foram avaliadas sensorialmente (teste de aceitabilidade com escala hedônica estruturada de 9 pontos) por 50 provadores em cada seção. Paralelamente, foi feito um monitoramento microbiológico das amostras quanto à presença de contaminantes.

O pH dos três tratamentos apresentou uma queda significativa ao longo dos 28 dias ($0,16$ a $0,21$) e foi significativamente menor ($p < 0,05$) para T2 ($4,67$ após 28 dias) em relação a T1 ($4,85$) e T3 ($4,76$). Quanto à viabilidade da cultura *starter*, os produtos apresentaram populações médias ao longo do armazenamento sempre acima de $8,95$ log UFC/g. As culturas probióticas NCFM e Bb-12 apresentaram contagens acima do mínimo recomendado pela legislação durante o armazenamento, com populações acima de 8 log UFC/g para Bb-12 e populações de NCFM que diminuíram significativamente ($p < 0,05$) de $8,61$ (7 dias) a $7,93$ log UFC/g (28 dias) para T2. *L. sakei* 2a mostrou-se adaptar bem ao produto lácteo, com viabilidade que se manteve na faixa de $8,10$ a $8,18$ log UFC/g ao longo dos 28 dias. Quanto ao perfil de textura, T2 foi mais estável durante o armazenamento, com parâmetros mais constantes ao longo do estudo, em comparação a T1 e T3. Na análise sensorial, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos durante os dias avaliados e, tampouco, entre os dias estudados para um mesmo tratamento. As amostras tiveram uma boa aceitação pelos provadores, principalmente T2, com notas médias acima de 7 (gostei regularmente), apesar de não diferirem significativamente. O produto inovador tipo patê de base láctea no sabor tomate desenvolvido mostrou-se um bom veículo para os micro-organismos probióticos *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* NCFM e para *L. sakei* 2a, potencialmente simbiótico e sensorialmente aceitável.

Palavras-chave: Probióticos, Prebióticos, Tomate, Produto tipo patê de base láctea.

ABSTRACT

STALIANO, C.D. **Development and characterization of a potentially synbiotic dairy-based spread product**. 2012. 96 f. Dissertation (Master of Science) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A remarkable trend in the food area is the development of products that are tasty, convenient, and able to bring healthy benefits. Within this scenario, functional food have been object of scientific studies to elucidate their benefits to the human being. Probiotics and prebiotics are physiologically active ingredients in food which positively influence the maintenance of the human gastrointestinal tract balance. A synbiotic product combines probiotic and prebiotics ingredients. The tomato is also remarkable, regarding some compounds with functional attributes in its composition. Lycopene is the pigment present in the fruit that has antioxidant potential and is correlated with reduced incidence of some cancer types. This study aimed to develop a potentially synbiotic quark cheese-based spread product containing tomato and with basil and parmesan cheese, as well as evaluating its physico-chemical and microbiological features, and its instrumental texture profile and sensory acceptability, during storage at 4 ± 1 °C for up to 28 days.

Three different trials of quark cheese-based spread product were produced (in triplicates), all supplemented with inulin: **T1** (control) with the starter culture *Streptococcus thermophilus* ST-M6; **T2** with the starter culture ST-M6 plus the addition of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, and **T3** with the starter culture ST-M6, the probiotic culture Bb-12, and the addition of *Lactobacillus sakei* 2a. The products were stored at 4 ± 1 °C and, during the sampling periods (1, 7, 14, 21, and 28 days), the viability of probiotics, starter culture, and *L. sakei* 2a was assessed. The adaptation of *L. sakei* 2a to the dairy matrix was also evaluated, once this bacteriocin-producing strain was isolated from a Brazilian sausage. Additionally, the pH and instrumental texture profile of the product was assessed (double penetration of samples test, using a TA-XT2 texture analyzer), and the chemical composition was determined, using samples kept frozen after the first day of production. Besides, the trials were sensory evaluated (acceptability test, using a 9-point structured hedonic scale), after 7, 14, and 21 days, by 50 consumers in each session. At the same time, samples were microbiologically monitored for the presence of contaminants.

The pH of the three trials displayed a significantly decrease throughout the 28 days of storage (0.16 up to 0.21), and it was significantly lower ($p < 0.05$) for T2 (4.67 after 28 days), compared to T1 (4.85) and T3 (4.76). Regarding the viability of the starter culture, the products showed mean populations always above 8.95 log CFU/g during storage. The probiotic cultures NCFM and Bb-12 displayed counts above the minimum recommended by the Brazilian regulatory standards throughout storage, with populations above 8 log CFU/g for Bb-12, and counts of NCFM decreased significantly ($p < 0.05$) from 8.61 (7 days) to 7.93 log CFU/g (28 days) for T2. *L. sakei* 2a was able to adequately adapt to the dairy product, with populations that maintained between 8.10 and 8.18 log CFU/g during the 28 days of storage. With respect to the texture profile, T2 was considered the most stable trial during storage, as displayed preservation of more homogeneous parameters throughout study, compared to T1 and T3. Regarding sensory evaluation, there were neither significant differences ($p > 0.05$) among the trials during the studied period nor among the studied periods for the same trial. The samples had a good acceptance by consumers, with mean scores above 7 (like regularly), mainly T2, although the trials did not differ significantly. The innovative tomato dairy-based spread product developed revealed to be an adequate matrix for the probiotic microorganisms *B. animalis* Bb-12 and *L. acidophilus* NCFM, and for *L. sakei* 2a, potentially synbiotic, and sensory acceptable.

Keywords: Probiotics, Prebiotics, Tomato, Dairy-based spread product.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma de processamento do queijo quark para os diferentes tratamentos propostos.....	41
Figura 2. Etapas da fabricação do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão, para os diferentes tratamentos propostos, após a obtenção do queijo quark.....	42
Figura 3. Foto do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão, acondicionado em embalagem plástica (PP).....	42
Figura 4. Gráfico de perfil de textura (força em Newton x tempo em segundos) gerado pelo analisador de textura TA-XT2 para o produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão.....	49
Figura 5. Diferença entre as médias dos escores sensoriais atribuídos pelos provadores femininos e masculinos aos tratamentos T1, T2 e T3 nos dias 7, 14 e 21 de armazenamento a 4 ± 1 °C. As barras representam os valores médios de cada gênero, com duas unidades de desvio padrão.....	74
Figura 6. Média dos escores atribuídos pelos voluntários para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>L. acidophilus</i> NCFM + <i>B. animalis</i> Bb-12) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a) durante 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).....	75
Figura 7. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a), na análise sensorial conduzida após 7 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	76
Figura 8. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a), na análise sensorial conduzida após 14 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	77
Figura 9. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a), na análise sensorial conduzida após 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis envolvidas na fabricação dos produtos tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão, para os tratamentos T1, T2 e T3.....	35
Tabela 2. Ingredientes usados na formulação definitiva dos três tratamentos do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão (adaptado de CARDARELLI <i>et al.</i> , 2008b).	38
Tabela 3. Composição centesimal (média $\pm$ desvio-padrão) obtida para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a), no produto final (matéria úmida), a partir de amostras congeladas no primeiro dia de armazenamento a 4 ± 1 °C.....	54
Tabela 4. Valores de pH (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos para o produto final (dia 1) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C, para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a).....	55
Tabela 5. Viabilidade (média $\pm$ desvio-padrão) de <i>S. thermophilus</i> ST-M6, <i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>B. animalis</i> Bb-12 e <i>L. sakei</i> 2a durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a).....	57
Tabela 6. Contagens de coliformes totais obtidas para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a) durante armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) p or até 28 dias.....	65
Tabela 7. Contagens de bolores e leveduras obtidas para os tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a) durante armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) p or até 28 dias.....	66
Tabela 8. Determinação de micro-organismos indicadores de contaminação nos tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a), aos 7 e 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C..	67
Tabela 9. Perfil de textura instrumental (média $\pm$ desvio-padrão) dos tratamentos T1 (controle), T2 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. acidophilus</i> NCFM) e T3 (com <i>B. animalis</i> Bb-12 + <i>L. sakei</i> 2a) após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 ± 1 °C..69	69

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1.Alimentos funcionais	13
1.2.Probióticos	16
1.3.Prebióticos	22
1.4.A matriz láctea e o produto tipo patê potencialmente simbiótico	25
1.5.O tomate como fonte de licopeno	28
1.6.Lactobacillus sakei como produtora de bacteriocinas	30
2.OBJETIVOS	34
2.1.Objetivo geral	34
2.2.Objetivos específicos	34
3.MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1.Delineamento experimental	35
3.2.Culturas empregadas e preparo dos respectivos inóculos	36
3.3.Elaboração do produto, tipo patê, de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão	37
3.4.Armazenamento do produto e períodos de amostragem	42
3.5.Determinação do pH	43
3.6.Determinação da composição centesimal do alimento	43
3.7.Determinação dos parâmetros microbiológicos	44
3.7.1.Determinação da viabilidade da cultura <i>starter</i> , culturas probióticas e <i>L. sakei</i> 2a	44
3.7.2.Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários	46
3.8.Determinação do perfil de textura instrumental	48
3.9.Análise sensorial	49
3.10.Análise estatística	51
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1.Parâmetros físico-químicos	52
4.1.1.Composição centesimal	52
4.1.2.Valores de pH	54
4.2.Parâmetros microbiológicos	56
4.2.1.Populações de <i>Streptococcus thermophilus</i> ST-M6, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM e <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a	56
4.2.2.Micro-organismos indicadores de contaminação	65
4.3.Perfil de textura instrumental	68
4.4.Análise sensorial	74
5.CONCLUSÕES	80

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alimentos funcionais

O desenvolvimento de novos produtos e de novas tecnologias de processamento de alimentos vem sendo influenciado por diversos fatores, dentre os quais, a demanda de consumidores por novas tendências em alimentos, com alegações de conveniência, praticidade, sabor e facilidade na conservação. As pessoas estão cada vez mais conscientes da necessidade de ingerir alimentos saudáveis que, além de nutrirem, promovam bem-estar e saúde - os chamados alimentos funcionais (SENÖRANS *et al.*, 2003).

Os alimentos funcionais afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de garantirem as funções nutricionais básicas, conduzindo a uma melhoria do estado geral de saúde e de bem-estar, promovendo uma redução do risco de doenças, como as crônicas não-transmissíveis (DCNT), incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, entre outras (LAJOLO *et al.*, 2001; STANTON *et al.*, 2005).

O termo alimentos funcionais foi inicialmente proposto no Japão, em meados de 1980, devido a uma população crescente de idosos e a constante preocupação do governo e das pessoas em prevenir doenças crônicas e degenerativas. Esse termo obteve *status* legal em 1991, sendo descrito como FOSHU - “Foods for Specific Health Use” – e, desde então, elaborou-se um processo de regulamentação específica para a aprovação de alimentos funcionais. Até julho de 2002, aproximadamente 300 produtos já tinham obtido a licença FOSHU, identificada através de um selo de aprovação do ministério da saúde e bem-estar japonês na embalagem do alimento (HASLER, 1998; HASLER, 2002; ARAI *et al.*, 2008).

A definição de alimentos funcionais é distinta da de nutracêuticos, uma vez que estes são compostos químicos bioativos com propriedades medicinais que atuam no tratamento e prevenção de doenças. Os nutracêuticos, geralmente, não estão associados aos alimentos e são apresentados na forma de pílulas, cápsulas, pós, xaropes, entre outras (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005).

A legislação brasileira para alimentos funcionais é regulamentada pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – através das resoluções RDC nº 18 e 19 datadas de abril de 1999, da RDC nº 2 datada de janeiro de 2002 e da lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos aprovada em julho de 2008. As alegações são aprovadas para o produto final que contenha os ingredientes ou componentes funcionais, com base em evidências científicas, analisadas caso a caso, considerando a formulação e as características do alimento. Busca-se essa padronização com o objetivo de melhorar a compreensão dos consumidores quanto às informações veiculadas nos rótulos dos alimentos (ANVISA, 1999a, 1999b, 2002, 2008).

Os principais macro e micronutrientes cujas propriedades fisiológico-funcionais têm sido demonstradas são os probióticos, os prebióticos, os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, as vitaminas antioxidantes, como a vitamina E, os carotenoides, os flavonoides, as fibras alimentares, entre outros (MORAES; COLLA, 2006). Vale ressaltar que tais substâncias classificadas como fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos em quantidades suficientes e adequadas para produzir o efeito fisiológico desejado.

Essa nova tendência na área de ciência dos alimentos e de nutrição vem sendo alvo de pesquisas, e vem ganhando destaque e prioridade na indústria de alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2011). Dessa forma, favorece e incentiva o aumento do consumo de alimentos enriquecidos com componentes fisiologicamente ativos, como os probióticos e os prebióticos, aditivos alimentares capazes de estimular a multiplicação e a manutenção do equilíbrio da microbiota benéfica do trato gastrointestinal humano (TGI) (SAAD, 2006).

Os principais mercados para os alimentos funcionais são o Japão, os Estados Unidos (EUA) e a Europa, com uma grande variedade de alimentos probióticos disponíveis nos supermercados, principalmente produtos lácteos, e, estima-se que o mercado de produtos funcionais nesses países movimentou, em 2005, em torno de US\$ 60 bilhões. No Brasil, no mesmo ano, o mercado foi avaliado em US\$ 600 milhões. Em 2006, dos R\$ 88,2 bilhões que as indústrias de alimentos brasileiras faturaram, apenas 0,8% foi proveniente das vendas de alimentos funcionais (SALGADO; ALMEIDA, 2008). Aproximadamente 65% dos alimentos funcionais no Brasil são adicionados de micro-organismos probióticos (CRUZ *et al.*, 2007).

No ano 2000, o mercado mundial de alimentos funcionais movimentou US\$ 33 bilhões de dólares. Em 2005, já foi um total de US\$ 73,5 bilhões de dólares (JUSTFOOD, 2006). A partir de 2010, existe uma estimativa de o mercado alcançar US\$ 167 bilhões de dólares, com um potencial crescimento de 10% ao ano (RESEARCH; MARKETS, 2008). Isso demonstra o crescente aumento do consumo de produtos funcionais.

No setor lácteo, os alimentos funcionais já são uma realidade e as indústrias estão desenvolvendo produtos com características cada vez mais atrativas, com a presença de probióticos, fibras, vitaminas, entre outros compostos (BELCHIOR,

2004). Os alimentos probióticos presentes nas gôndolas dos supermercados brasileiros são representados pelos leites fermentados Yakult, Activia e Actimel da Danone, o iogurte Biofibras da Batavo, o queijo SanBIOS da Cooperativa Santa Clara, entre outros. Como reflexo da expansão desse mercado, há muitas pesquisas que visam à obtenção de novos produtos que não se restrinjam apenas ao setor lácteo (ROBERFROID, 2005).

1.2. Probióticos

Os probióticos são micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2008).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota do TGI humano inclui fatores como: melhoria do funcionamento intestinal, redução de pH do intestino, modulação da resposta imune, tratamento e prevenção de diarreia por rotavírus, restabelecimento da microbiota intestinal normal após terapia por antibióticos, produção de vitaminas B (ácido fólico), redução de amônia e de outros componentes tóxicos, redução de colesterol, aumento da tolerância à lactose, prevenção ou tratamento de desordens intestinais, entre outros (PICARD *et al.*, 2005; GIBSON; ROBERFROID 2008). Adicionalmente, as cepas probióticas atuam na modulação da microbiota intestinal, competindo por sítios de adesão, por nutrientes e produzem compostos antimicrobianos. Elas estimulam a multiplicação de bactérias benéficas e inibem a proliferação de patógenos, bem como aumentam a biodisponibilidade de certos nutrientes, como os ácidos graxos de cadeia curta (propiónico, butírico),

proteínas, minerais (cálcio) e promovem efeitos benéficos sobre o metabolismo ósseo (SAAD *et al.*, 2011a).

Além dos efeitos benéficos dos probióticos sobre a microbiota no TGI, foram estudados, também, seus efeitos antipatogênicos em sítios extra-intestinais, como na pele (PERAL *et al.*, 2009), no trato vaginal (MARTINEZ *et al.*, 2009) e no estômago (PARK *et al.*, 2007).

A fim de promoverem benefícios à saúde, as cepas probióticas precisam permanecer viáveis durante o armazenamento do alimento. Adicionalmente, estas devem ser capazes de resistir à passagem pelo TGI, apresentar resistência ao suco gástrico e à bile, aderir às células do epitélio humano e, preferencialmente, colonizar o intestino e produzir substâncias antimicrobianas, por exemplo, as bacteriocinas (KAILASAPATHY; CHIN, 2000; SENOK *et al.*, 2005). Uma das mais importantes características das cepas é que sejam não-patogênicas e reconhecidamente seguras (GRAS – *Generally recognized as safe*) (GORBACH, 2002).

Dentre os micro-organismos probióticos mais aplicados, destacam-se as bactérias lácticas (BAL), como as cepas de lactobacilos, e as bifidobactérias, principalmente em produtos lácteos fermentados (MARUYAMA *et al.*, 2006). No caso das BAL, estas podem reduzir os níveis de enzimas no cólon capazes de converter substâncias pró-carcinogênicas em carcinogênicas, como a β -glucuronidase, nitro-redutase e azo-redutase. Muitos estudos em humanos e animais indicam que o consumo de algumas BAL diminui a atividade e os níveis de enzimas fecais possivelmente envolvidas na formação de carcinógenos (KUMAR *et al.*, 2010).

Dentre as espécies de lactobacilos e bifidobactérias mais empregadas, destacam-se: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *ramnosus*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B.*

bifidum, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, entre outras (SAXELIN, 2008; AURELI *et al.*, 2010).

Lactobacillus acidophilus são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, homofermentativas e catalase-negativas. Podem ser encontradas no TGI de humanos e animais, como em produtos fermentados (KLEIN *et al.*, 1998). As cepas pertencentes a essa espécie são as mais empregadas em iogurtes e outros leites fermentados, com seus efeitos benéficos bem caracterizados tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, incluindo a manutenção do balanço da microbiota do TGI, imunomodulação, exclusão de patógenos e alívio de sintomas de resfriado em crianças (COLLADO *et al.*, 2007; GOH; KLAENHAMMER, 2010).

Lactobacillus acidophilus NCFM é uma bactéria presente em humanos e tem sido utilizada comercialmente há mais de 35 anos como cultura probiótica em suplementos dietéticos, leites, iogurtes e fórmulas infantis. Essa cepa é extremamente resistente às condições de baixo pH, possui a capacidade de sobreviver no TGI, aderir às células da mucosa intestinal, conforme verificado em teste *in vitro*, prevenir gastroenterites microbianas, ajudar na digestão de lactose em indivíduos intolerantes a esse açúcar e atuar na modulação da resposta imune (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001). MONTES *et al.* (1995) observaram que o consumo de leite suplementado com altas concentrações de NCFM reduziu os sintomas de intolerância à lactose (diarreia, gases, inchaço) em 9 de 10 crianças que apresentavam esses sintomas.

A cepa NCFM é produtora de bacteriocina designada lactacina B, conforme relatado pelos autores BAREFOOT e KLAENHAMMER (1983). Entretanto, testes *in vitro* não demonstraram a inibição de patógenos pela ação dessa bacteriocina que somente inibiu outras espécies de *Lactobacillus* e de *Enterococcus faecalis*.

NCFM tem sido largamente estudada *in vitro*. Entretanto, estudos em humanos comparando a sobrevivência dos probióticos após passagem pelo TGI, em diferentes matrizes alimentares, são importantes para validar as pesquisas de simulação *in vitro* (SANDERS; MARCO, 2010). VARCOE *et al.* (2002) inocularam NCFM em leite desnatado e em água e, por meio de testes clínicos, não verificaram diferença na contagem de colônias obtidas de amostras fecais de humanos. Com isso, os autores desconsideraram a hipótese de que a matriz na qual o *L. acidophilus* NCFM foi inoculado influenciaria o número de células viáveis presentes em amostras fecais.

As bifidobactérias são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbias e catalase-negativas (GOMES; MALCATA, 1999). São heterofermentativas, podendo produzir ácido láctico, etanol, ácido acético e ácido fórmico, através do metabolismo de carboidratos e, também, pequenas quantidades de dióxido de carbono e ácido succínico. Elas representam os principais componentes da microbiota intestinal humana e são capazes de modular essa microbiota, principalmente na região do cólon do TGI. Consequentemente, elas podem exercer efeitos benéficos à saúde, incluindo inibição de micro-organismos patogênicos, produção de vitaminas, atividade anticarcinogênica e efeitos imunoestimulantes (JALILI *et al.*, 2009).

As bifidobactérias têm sido largamente empregadas na indústria de produtos lácteos em mais de 70 produtos, incluindo leites fermentados, iogurtes, queijos e sorvetes, distribuídos no mercado de alimentos em todo o mundo (SHAH, 2004).

A cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi encontrada no intestino de crianças e estimula a produção de imunoglobulina IgA, exercendo um papel importante para o sistema imunológico. O efeito benéfico de Bb-12 para a

saúde humana é cientificamente reconhecido, tanto por estudos *in vitro* e *in vivo* (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; HANSEN *et al.*, 2002; SAARELA *et al.*, 2005, 2006) quanto por estudos realizados em humanos (LARSEN *et al.*, 2006; WILDT *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2007).

A cepa de Bb-12 foi isolada em 1983 pela Christian Hansen. Representa uma das bactérias probióticas mais estudadas, largamente utilizada para fins comerciais em uma variedade de aplicações em alimentos e suplementos dietéticos, com mais de 200 publicações científicas envolvendo o seu uso (OUWEHAND *et al.*, 2002; GARRIGUES *et al.*, 2010). Apresenta algumas características tecnológicas desejáveis, como resistência a ácidos e capacidade de se multiplicar em meio de base láctea (JANER *et al.*, 2005).

Conforme modificações introduzidas na legislação brasileira, por parte da Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 1999), recomenda-se a ingestão de uma porção mínima diária do alimento contendo 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de micro-organismos probióticos viáveis no produto pronto para consumo (ANVISA, 2008). Ressalta-se, no entanto, que a somatória de produtos probióticos consumidos ao longo do dia deve ser levada em consideração, bem como a maior variedade desses produtos disponíveis atualmente no mercado, para atingir a quantidade mínima necessária (KOMATSU *et al.*, 2008).

Diversos fatores podem afetar a fisiologia celular dos probióticos, tais como: as condições de fermentação, o tratamento térmico (parâmetros de produção); a formulação, a presença de oxigênio, o conteúdo de umidade, o pH, a acidez, a temperatura, o tipo de embalagem (parâmetros do produto) e os sais biliares, a

produção de enzimas pancreáticas, a microbiota e a resposta imune do hospedeiro (parâmetros do hospedeiro) (SANDERS; MARCO, 2010).

Uma alternativa para manter a viabilidade de probióticos é adicionar outra espécie probiótica em co-cultura, como, por exemplo, lactobacilos e bifidobactérias adicionados a um mesmo produto. Entretanto, é importante ressaltar que as cepas empregadas em conjunto sejam compatíveis entre si para oferecer o melhor resultado no processo tecnológico e garantir a sua viabilidade durante o armazenamento do produto (KOMATSU *et al.*, 2008).

Adicionalmente, os probióticos podem ser suplementados nos alimentos em co-cultura com uma cultura *starter* e, para isso, devem ser testados previamente, a fim de avaliar a sua proporção e a compatibilidade entre os diferentes micro-organismos adicionados. A viabilidade das cepas individuais deve ser acompanhada, desde a elaboração do produto até o final de seu armazenamento, ao longo de toda a vida de prateleira (KOMATSU *et al.*, 2008).

O grupo de pesquisa do laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) tem desenvolvido vários produtos probióticos, prebióticos e simbióticos. Dentre eles, ARAGON-ALEGRO *et al.* (2007) desenvolveram uma musse de chocolate suplementada com *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82, associada ou não à inulina. Os autores observaram que a viabilidade da cepa probiótica manteve-se acima de 7 log UFC/g durante todo o período de armazenamento refrigerado. Adicionalmente, a qualidade sensorial do produto não foi alterada pela presença de probiótico e prebiótico, em relação à formulação tradicional. A presença de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 resultou em um produto mais firme, quando

comparado ao tradicional, característica esta que foi intensificada pela presença do prebiótico inulina (CARDARELLI *et al.*, 2008a).

O desenvolvimento de novos produtos funcionais tem resultado em um crescimento exponencial do mercado de probióticos nos últimos cinco anos. O mercado global de ingredientes, suplementos e alimentos probióticos movimentou US\$ 16 bilhões em 2008 e estima-se um total de US\$19,6 bilhões em vendas para 2013, a uma taxa de crescimento de 4,3% ao ano (FOOD PROCESSING, 2009).

Os alimentos adicionados de monoculturas ou culturas mistas de micro-organismos vivos tornaram-se importantes produtos comerciais, com destaques nas gôndolas dos supermercados e em propagandas disseminadas nos principais meios de comunicação (SAXELIN, 2008).

1.3. Prebióticos

Os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentados que promovem mudanças específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrintestinal e conferem benefícios ao hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004). A atividade prebiótica reflete a capacidade de um dado substrato em estimular a multiplicação de um micro-organismo em relação aos outros (HUEBNER *et al.*, 2007).

Para atuarem como funcionais, os prebióticos precisam ser quimicamente estáveis às técnicas de processamento de alimentos, como a aplicação de calor, baixo pH, às reações de Maillard, entre outras, visando manter a mesma atividade funcional pós-tratamento (HUEBNER *et al.*, 2008).

A atividade prebiótica é atribuída a alguns componentes de alimentos, particularmente oligossacarídeos e polissacarídeos não digeríveis, capazes de resistir ao processo digestivo na parte superior do TGI. São hidrolisados e

fermentados pela microbiota da parte inferior do TGI (cólon), estimulando a multiplicação e/ou atividade de um número limitado de bactérias benéficas. As bifidobactérias estão entre as bactérias presentes no intestino e estimuladas pelos prebióticos. A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) têm sido os prebióticos mais estudados (GIBSON; ROBERFROID, 2008).

De acordo com o proposto por alguns trabalhos, a dose diária de consumo de inulina e/ou oligofrutose para estimular a multiplicação de bifidobactérias no cólon varia de 4 - 5 g até 20 g durante um período de, pelo menos, 15 dias (ROBERFROID, 1999; SHAH, 2000; VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

Para a legislação brasileira, de acordo com a ANVISA (2008), a quantidade recomendada de consumo de inulina para que o produto tenha a alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde é de, no mínimo, 3 g de inulina para alimento sólido ou 1,5 g em caso de alimento líquido, por porção do produto pronto para o consumo, determinada pela RDC n° 359 de dezembro de 2003 (ANVISA, 2003).

A inulina, presente em muitos vegetais, é um carboidrato não digerível que pertence à classe dos frutanos e possui estrutura polimérica predominantemente linear, com ligações β -(2→1) entre as unidades de frutose. Como é capaz de estimular a multiplicação de um grupo de bactérias benéficas no cólon, ocorre, conseqüentemente, a diminuição de outras espécies prejudiciais. Atua, também, na melhoria do metabolismo das gorduras e da resposta glicêmica, aumenta a biodisponibilidade de minerais, como cálcio e magnésio, melhora as funções imunológicas, possui efeito protetor sobre a motilidade gastrintestinal (GI), melhorando os sintomas da constipação (FRANCK, 2006; MADRIGAL; SANGRONIS, 2007; RUSSO *et al.*, 2011).

Conforme relatado por BOHM *et al.* (2006), o aquecimento da inulina a 195 °C por 30 minutos resultou na degradação completa das cadeias de frutanos e na formação de novos produtos de baixo peso molecular. Embora a inulina aquecida tenha sido quimicamente alterada, quando esta foi adicionada a uma cultura fecal mista, apresentou, significativamente, maior estímulo da multiplicação de bifidobactérias, com a diminuição de potenciais patógenos.

A inulina industrial é obtida da raiz da chicória e pode ser usada como ingrediente prebiótico em diversos alimentos. É caracterizada como um pó branco, inodoro, de sabor neutro e sem gosto residual. Quanto à sua funcionalidade, proporciona corpo e palatabilidade a produtos lácteos, age como emulsificante, possui capacidade de formar gel, pode substituir açúcares e gorduras na formulação de produtos e apresenta sinergismo com edulcorantes (MADRIGAL; SANGRONIS, 2007). Conforme constataram BURITI *et al.* (2008), a inulina presente no queijo fresco cremoso adicionado de probiótico resultou em um produto com características sensoriais agradáveis ao consumidor e propriedades funcionais agregadas.

Quando combinados com os probióticos, os prebióticos resultam em alimentos denominados simbióticos (HAMILTON-MILLER, 2004). Essa associação pode resultar em sinergismo, no sentido dos prebióticos favorecerem seletivamente os probióticos, resultando na formação de pares substrato-micro-organismo ideais (GIBSON *et al.*, 2004).

Há evidências de que a coadministração de prebióticos melhora a sobrevivência de algumas cepas de lactobacilos e de bifidobactérias em intestino de ratos (SU *et al.* 2007). Estudos em animais sugerem que os alimentos simbióticos promovem benefícios adicionais, comparados à ação dos probióticos e prebióticos isoladamente. Como exemplo, a administração oral de soro de leite com prebiótico e

B. breve M-16V em ratos conferiu-lhes uma melhor proteção contra o desenvolvimento de sintomas de alergia ao leite de vaca (SCHOUTEN *et al.*, 2009).

1.4. A matriz láctea e o produto tipo patê potencialmente simbiótico

A matriz alimentar empregada como veículo de probióticos pode influenciar a funcionalidade dos micro-organismos de maneiras distintas, como induzindo mudanças fisiológicas e em sua composição celular, fornecendo outros ingredientes complementares fisiologicamente ativos, por exemplo, fibras, compostos bioativos e produtos finais da fermentação, tais como ácidos orgânicos, bacteriocinas, etc. Esses fatores possivelmente afetam a capacidade/característica das células ao longo da vida de prateleira do produto (SANDERS; MARCO, 2010).

O leite é um excelente exemplo de alimento nutritivo que pode contribuir para o benefício à saúde descrito para as bactérias probióticas. O leite bovino oferece uma nutrição completa com proteínas, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e minerais. Além disso, é fonte de compostos bioativos, como cálcio, oligossacarídeos, lactoferrina, imunoglobulinas, entre outros (SEVERIN; XIA, 2005; SANDERS; MARCO, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que as bactérias probióticas sobrevivem melhor em leite, queijo e iogurte, quando comparados a soluções tampões ou salinas, durante a exposição às condições gástricas (SHARP *et al.*, 2008).

Dentre os derivados lácteos, os queijos se constituem como veículos apropriados para cepas probióticas, uma vez que apresentam capacidade tamponante. Eles possuem pH mais elevado, comparado ao de iogurte e de leite fermentado, protegem os micro-organismos dos ácidos estomacais e ajudam a manter a maior viabilidade celular. Além disso, o queijo possui uma densa matriz

capaz de oferecer proteção adicional à bactéria no estômago (HAYES *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2009).

O queijo *petit-suisse* simbiótico desenvolvido no laboratório de Tecnologia de Alimentos da FCF/USP é preparado a partir da massa-base láctea denominada quark ou quarg, caracterizada como um coalho desnatado não maturado, de aspecto suave e sabor ligeiramente ácido. A partir dessa massa-base, podem-se obter vários tipos de queijos, dependendo dos ingredientes adicionados (CARDARELLI *et al.*, 2008b).

MARUYAMA *et al.* (2006) desenvolveram um queijo *petit-suisse* probiótico, formulado com *L. acidophilus*, *B. longum* e com diferentes combinações de gomas xantana, carragena e guar. O queijo obtido apresentou textura estável e as populações de probióticos mantiveram-se acima de 6 log UFC/g (unidades formadoras de colônia/grama) para *L. acidophilus* e de 7 log UFC/g para *B. longum*, durante o armazenamento do produto a 4 ± 1 °C por até 21 dias. O emprego das gomas guar, xantana e carragena é tecnologicamente viável, com o objetivo de proporcionar uma textura desejada, pois as gomas têm a função de espessar, conferir estabilidade e proporcionar viscosidade ao produto (THEBAUDIN *et al.*, 1997).

CARDARELLI *et al.* (2008b), por sua vez, desenvolveram um queijo *petit-suisse* potencialmente simbiótico, suplementado com inulina, oligofrutose e/ou mel. Os autores obtiveram um produto com elevado potencial prebiótico e qualidade sensorial. Os autores relataram que o maior conteúdo de frutanos foi observado para os queijos suplementados com inulina e oligofrutose e, que os prebióticos não foram consumidos durante o armazenamento dos produtos.

Anteriormente, CARDARELLI *et al.* (2007) verificaram o efeito prebiótico *in vitro* de cinco formulações de queijos *petit-suisse* probiótico e simbiótico, combinando cepas probióticas *L. acidophilus* (La-5) e *B. lactis* (BL04), e uma mistura prebiótica de inulina, oligofrutose e mel. A medição do efeito prebiótico foi realizada por fermentações em batelada, utilizando inóculo fecal e analisando as mudanças na composição e na atividade de vários grupos de bactérias da microbiota. De forma geral, a adição de prebióticos ao queijo probiótico (elaborado com a cultura *starter* de *S. thermophilus* + probióticos) resultou em fermentações mais rápidas e em uma maior produção de ácido láctico, promovendo o incremento das populações de bifidobactérias e lactobacilos.

A massa quark do queijo *petit-suisse* é obtida pelo processo de coagulação mista (enzimática e ácida), utilizando-se leite desnatado, o qual é adicionado de creme de leite, para proporcionar uma consistência cremosa. À massa, pode-se adicionar tanto ingredientes doces, como no caso do *petit-suisse* sabor morango, como ingredientes salgados (SANDRAZ, 1989).

Para a elaboração de produtos salgados a partir da massa-base quark, visando avaliar a viabilidade dos probióticos em meio com adição de sal, podem ser testadas formulações com diferentes ingredientes. Sendo assim, uma possibilidade interessante é o desenvolvimento de um produto salgado, tipo patê (*spread*), adicionado de tomate, fruto que apresenta propriedades benéficas à saúde, devido à presença de antioxidantes, como o licopeno. Além disso, a adição de outras cepas de BAL ao produto lácteo salgado, como *Lactobacillus sakei* 2a, produtora de substâncias antimicrobianas, mostra-se interessante para avaliar o comportamento e a viabilidade do micro-organismo na matriz em estudo, bem como seu potencial de aplicação como cultura *starter* em produtos lácteos fermentados.

1.5. O tomate como fonte de licopeno

Dentre as hortaliças, o tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma variedade muito popular e importante na alimentação humana. É proveniente das Américas, da região Andina, do norte do Chile, passando pelo Peru até o Equador, local de origem das espécies silvestres, cuja domesticação foi feita por tribos indígenas que habitavam o México (SILVA; GIORDANO, 2000). É a hortaliça mais industrializada no mundo, com valores expressivos em volumes de produção, quando comparados às demais. Na América do Sul, o Brasil lidera a produção de tomate para processamento industrial, sendo o maior mercado consumidor de seus derivados industrializados (SILVA; GIORDANO, 2000; MELO; VILELA, 2005).

No contexto mundial, o cenário é outro, sendo que o país ocupava a sexta posição no ranking dos países com maior volume mundial de processamento de tomate. Os EUA lideravam com 33,99% da produção total no ano de 2007, representando um volume de 11.430.000 toneladas (t) de tomate processado, seguidos pela China, com 15,11%, Itália, com 14,76%, Espanha, com 5,55%, Turquia, com 4,92%, e o Brasil, com 4,04%, um volume de produção de 1.290.000 t, de acordo com os dados da TOMATOLAND (2008).

O tomate atua como importante ingrediente na dieta humana, sendo consumido fresco ou processado, com uma diversidade de produtos. Esses produtos possuem sabores doces, salgados, mais ácidos ou picantes, como os produtos desenvolvidos pela indústria e com boa aceitação pelo consumidor: *catchup*, tomate seco, polpa de tomate, molhos, purês, tomates inteiros pelados, sucos, entre outros. Aproximadamente, 80% do tomate produzido nos EUA são consumidos na forma processada (LUCIER *et al.*, 2000).

O fruto é composto por, aproximadamente, 93% a 95% de água, sendo que nos 5% a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, proteínas, minerais, lipídios, vitaminas, entre outros (SILVA; GIORDANO, 2000). As variedades híbridas para processamento são fontes de vitamina C, de outros nutrientes e de fitoquímicos, como vitamina A, licopeno e flavonoides (PIEPER; BARRETT, 2009).

Nos últimos anos, o tema tomate e saúde vem ganhando uma considerável importância mundial, o que pode ser um poderoso argumento para alavancar seu consumo e produção. Seu consumo é associado às suas propriedades nutritivas e aos benefícios à saúde, como diminuição dos níveis de lipídios séricos, redução da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, entre outros. Esses efeitos protetores à saúde têm sido atribuídos à presença de antioxidantes chaves, como o licopeno e o β -caroteno, solúveis em lipídios, como também os solúveis em água: vitamina C, flavonoides, entre outros (DALL'ASTA *et al.*, 2009).

O licopeno, pigmento presente no fruto, é um carotenoide acíclico com 11 duplas ligações conjugadas. Representa 80 a 90% do total de pigmentos presentes no tomate e é responsável pela cor vermelha característica de frutos maduros e processados, como tomate, mamão, pitanga, goiaba vermelha e melancia (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; HELYES *et al.*, 2009).

A quantidade de licopeno presente no fruto depende de fatores genéticos, ambientais (temperatura, luz, água e quantidade de nutrientes disponíveis), das técnicas de agricultura, das condições de colheita, pós-colheita, armazenamento e da variedade cultivada (DUMAS *et al.*, 2003; HELYES *et al.*, 2009). A quantidade de licopeno é, principalmente, determinada pela genética das variedades cultivadas, com concentrações que variam desde 3,93 a 17,1 mg/100 g de tomate. O tomate

tipo cereja é o que apresenta maior quantidade de licopeno, quando comparado às outras variedades (HELYES *et al.*, 2003; KUTI; KONORU, 2005).

O licopeno é relativamente resistente à degradação térmica e é mais absorvido pelo corpo humano na forma de pasta de tomate, o que aumenta o valor funcional do produto processado, em relação ao tomate *in natura* (PEREZ-CONESA *et al.*, 2009).

Resultados de estudos epidemiológicos conduzidos na União Europeia e nos EUA têm sugerido que as propriedades antioxidantes do licopeno são capazes de prevenir diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas. O licopeno atua, amenizando os efeitos dos radicais livres, moléculas instáveis que danificam as células sadias do organismo (LUGASI *et al.*, 2004; MELO; VILELA, 2005).

A quantidade exata para ingestão de licopeno é desconhecida. Em um estudo realizado pela Universidade de Harvard, concluiu-se que, para uma melhor proteção contra o câncer de próstata, os homens consumiram ao menos 6,5 mg/dia de licopeno (GIOVANNUCCI *et al.*, 1995; KANETSKY *et al.*, 1998).

1.6. *Lactobacillus sakei* como produtora de bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizadas no ribossomo das células de determinadas linhagens de BAL e liberadas no meio extracelular, com ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como alguns importantes patógenos de veiculação alimentar: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HERNANDEZ *et al.*, 2005).

Mais de cem bacteriocinas de BAL são conhecidas, subdivididas em cinco classes. Porém, a maioria pertence às classes I e II (COTTER *et al.*, 2005). As bacteriocinas da classe I são peptídeos pequenos (< 5 kDa), termoestáveis, que apresentam em sua molécula aminoácidos incomuns, como a lantionina e a metil-lantionina e, por essa razão, são frequentemente citadas como “lantibióticos” (DEEGAN *et al.*, 2006). A nisina, bacteriocina da classe I, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, constitui a única bacteriocina que, até o momento, foi aprovada para uso como aditivo alimentar pelo U.S. FDA (United States Food and Drug Administration) e pela Comunidade Europeia (GRATTEPANCHE *et al.*, 2008). As bacteriocinas da classe II são, também, peptídeos pequenos (<10 kDa) e termoestáveis. Porém, não contêm resíduos de lantionina ou metil-lantionina. Elas são divididas em duas sub-classes: as bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes* (sub-classe IIa) e as que têm dois componentes (sub-classe IIb). A sakacina P é uma bacteriocina que pertence à classe IIa e é produzida por *Lactobacillus sakei* (HOLCK *et al.*, 1994).

A eficiência da atividade das bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de BAL depende da composição química e das condições físicas dos alimentos. Elas podem ser adversamente afetadas pelos componentes presentes no alimento, pelas condições de processamento e estocagem, como pH e temperatura de armazenamento do produto (NASCIMENTO *et al.*, 2008). O sal de cozinha (NaCl), em determinadas concentrações, pode reduzir a multiplicação de culturas lácticas e, conseqüentemente, a produção de bacteriocinas. Além disso, o sal pode proteger os micro-organismos-alvo, como *L. monocytogenes*, da ação das bacteriocinas (HUGAS *et al.*, 2002). SARANTINOPOULOS *et al.* (2002) observaram uma redução

na atividade da bacteriocina e na taxa de multiplicação de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 após a adição de 2% de NaCl em caldo MRS.

Há um crescente interesse na indústria de alimentos pelo potencial de utilização de bacteriocinas em substituição aos aditivos químicos, como os conservantes químicos largamente empregados, uma vez que elas não alteram a qualidade sensorial do produto (RODGERS, 2001). Entretanto, para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos, ela precisa atender a alguns requisitos básicos, tais como: a linhagem produtora deve ter *status* GRAS, a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos em alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles, deve ser termoestável, não pode apresentar risco à saúde do consumidor, possuir efeito benéfico sobre o produto, aumentando a sua segurança, sem alterar a qualidade nutricional e sensorial do alimento (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

BAL são micro-organismos largamente utilizados na produção de alimentos fermentados. Diversas espécies são comercialmente importantes, dentre elas, está o *Lactobacillus sakei*, comumente associado a produtos fermentados, tanto de origem animal como vegetal (CHAILLOU *et al.*, 2005). É a cultura predominantemente presente em linguiças (AMMOR *et al.*, 2005).

Lactobacillus sakei é uma bactéria heterofermentativa facultativa com grande potencial biotecnológico, como agente de bioconservação em alimentos, prevenindo a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (GAO *et al.*, 2008; ZHAI *et al.*, 2009).

Durante o processo tecnológico, *L. sakei* é exposta a condições severas de estresse, como temperaturas frias e a presença de sal. Entretanto, essa cepa é capaz de proliferar-se em temperaturas de refrigeração e na presença de altas

concentrações de sal (até 9% de NaCl), desempenhando um papel importante no processamento de carnes (CHAMPOMIER-VERGÈS *et al.*, 2001).

Lactobacillus sakei subsp. *sakei* 2a é uma bactéria Gram-positiva, aerotolerante e não produz esporos. É capaz de fermentar açúcares, como sacarose, glicose, maltose, lactose, arabinose e galactose, segundo ESPÍRITO SANTO *et al.* (2003). Foi isolada de linguiça frescal brasileira pelo grupo de pesquisa da professora Bernadette Franco, do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FBA) da FCF/USP. *L. sakei* 2a produz bacteriocinas termorresistentes, como a sakacina P, capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura e em produtos cárneos (LISERRE *et al.*, 2002; DRIDER *et al.*, 2006).

DAL BELLO *et al.* (2003) demonstraram que as espécies de *L. sakei* estão presentes na microbiota do TGI. Entretanto, com relação à *L. sakei* 2a, ainda não há evidências científicas do seu potencial probiótico e do efeito da produção de bacteriocinas no TGI (BAMBIRRA *et al.*, 2007). Em contrapartida, pesquisas vêm sendo realizadas a fim de investigar o potencial efeito probiótico de *L. sakei* 2a.

Novas tecnologias e conhecimentos científicos vêm sendo aplicados em pesquisas na área de ciência e tecnologia de alimentos com propriedades funcionais, a fim de se obter produtos cada vez mais saudáveis e sensorialmente aceitáveis. O desenvolvimento de um produto, tipo patê, potencialmente simbiótico se encaixa nessa tendência pela demanda de alimentos que agreguem sabor, prazer, praticidade, conveniência e tragam benefícios à saúde.

A ideia de associar um produto potencialmente simbiótico salgado, suplementado com uma mistura de probióticos e de fibra prebiótica inulina, mais o tomate, outro ingrediente com apelo funcional, e, ainda, verificar a viabilidade da cepa isolada de produto cárneo, *L. sakei* 2a, em meio lácteo é deveras promissora e inovadora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um novo produto salgado potencialmente simbiótico, tipo patê, de base láctea (à base de queijo quark), adicionado de tomate, manjerição e queijo parmesão, dentre outros ingredientes.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 no produto tipo patê, associados à cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus*;
- Verificar a viabilidade e a possível adaptação ao meio lácteo de *Lactobacillus sakei* 2a no produto, associado a uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12;
- Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial, suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental durante o seu armazenamento sob refrigeração a 4 ± 1 °C por até 28 dias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 3 tipos de combinações (tratamentos), em termos de culturas adicionadas durante a fabricação dos produtos tipo patê: T1 = apenas cultura *starter* *S. thermophilus* ST-M6 (controle); T2 = cultura *starter* ST-M6 + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 + *Lactobacillus acidophilus* NCFM; T3 = cultura *starter* ST-M6 + Bb-12 + *Lactobacillus sakei* 2a e 5 tempos (1, 7, 14, 21 e 28 dias), com três repetições (triplicata) de cada tratamento.

Os tratamentos e as suas variáveis empregadas na fabricação do produto tipo patê estão elucidados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis envolvidas na fabricação dos produtos tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão, para os tratamentos T1, T2 e T3.

Tratamentos	<i>Streptococcus thermophilus</i> ¹	<i>Bifidobacterium animalis</i> ²	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ³	<i>Lactobacillus sakei</i> 2a ⁴
T1*	+	-	-	-
T2	+	+	+	-
T3	+	+	-	+

¹*Streptococcus thermophilus* ST-M6 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca), ²*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen); ³*Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco, Dangé, França) e ⁴*Lactobacillus sakei* 2a (Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FBA/FCF/USP, São Paulo, Brasil)

* patê controle

+ = adição - = sem adição

3.2. Culturas empregadas e preparo dos respectivos inóculos

Os seguintes micro-organismos foram utilizados durante a produção do produto tipo patê: a cultura *starter Streptococcus thermophilus* ST-M6 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) na concentração 0,01% (m/v), as culturas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen) a 0,03% (m/v) e *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco, Dangé, França) a 0,05% (m/v) (em substituição ao *Lactobacillus acidophilus* La-5 [Christian Hansen] a 0,02% [m/v], testado em ensaios preliminares) e *Lactobacillus sakei* 2a. Com exceção de *L. sakei* 2a, todas as culturas empregadas eram liofilizadas do tipo DVS (*direct vat set* – para inoculação direta ao leite durante a preparação do queijo) e foram adicionadas em determinadas concentrações a fim de atingirem populações mínimas de 7 log UFC/g durante a produção e ao longo do armazenamento.

A cultura de *Lactobacillus sakei* 2a, isolada de linguiça frescal brasileira e caracterizada como sendo produtora de bacteriocinas que apresentam efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em meio de cultura e também em produtos cárneos (DE MARTINIS; FRANCO, 1997, 1998, 2001; LISERRE *et al.*, 2002), pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do FBA/FCF/USP. As células obtidas de uma cultura estoque, mantida a -80°C em glicerol, foram utilizadas para a preparação do inóculo. As células foram reativadas mediante dois repiques sucessivos em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Após cada repique, as culturas permaneciam em estufa a 30 °C por 24 horas. As células foram centrifugadas (5.251,4 xg/10 min) para a preparação do pré-inóculo. O pré-inóculo (4% v/v) foi transferido para um volume maior de caldo MRS e incubado a 30°C, até que as células alcançassem a fase exponencial (aproximadamente 14-16h).

Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (5.251,4 xg/10 min) e lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), repetindo-se o processo de centrifugação e lavagem duas vezes para o pré-inóculo, até que se obtivesse o *pellet*. O *pellet* era, então, inoculado no leite durante a fabricação do queijo quark.

3.3.Elaboração do produto, tipo patê, de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão

Os seguintes ingredientes comerciais foram empregados durante a elaboração do produto tipo patê, para os três tratamentos (T1, T2 e T3): leite pasteurizado tipo A desnatado (Salute, Descalvado, Brasil; processo HTST [alta temperatura baixo tempo]), polpa de tomate processada com sal e açúcar (Pomodoro, Goiânia, Brasil; 5,8 Brix), tomate seco (Agro Industrial Itaguaçu, Itaguaçu da Bahia, Brasil; desidratação em estufa solar a temperatura ≤ 65 °C), creme de leite esterilizado (Nestlé, Araçatuba, Brasil; 25% de lipídios), manjerição desidratado (Fuchs, Itupeva, Brasil), queijo parmesão ralado (Faixa Azul Vigor, São Paulo, Brasil), sal moído iodado (Cisne, Cabo Frio, Brasil), azeite de oliva extra virgem (Gallo, Mairinque, Brasil; 0,5% acidez máxima), açúcar refinado União (União, Limeira, Brasil), goma Grindsted® Guar 250 (Danisco, Cotia, Brasil), goma Grindsted® Xantana 80 (Danisco), goma Grindsted® Carragena CY500 (Danisco) e fibra prebiótica inulina GR (Orafti, Oreye, Bélgica) (Tabela 2). Além desses ingredientes comerciais, foi adicionado, também, o soro de leite obtido durante o processo de fabricação do queijo quark.

A Tabela 2 apresenta os ingredientes que compõem a formulação definitiva do produto tipo patê. Essa formulação foi definida após oito ensaios-piloto realizados, onde a fórmula do produto sofreu algumas variações, a fim de promover

o seu balanceamento e a adição de alguns ingredientes, como o tomate seco, para intensificar o sabor do produto. A partir daí, obteve-se a formulação mais adequada, sob o ponto de vista de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante o armazenamento.

Tabela 2. Ingredientes usados na formulação definitiva dos três tratamentos do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjeriço e queijo parmesão (adaptado de CARDARELLI *et al.*, 2008b).

Ingredientes	Quantidade (g/100g)
Queijo quark	50,00
Polpa de tomate	14,00
Crema de Leite	13,00
Tomate seco	11,00
Inulina	4,00
Soro de leite	2,60
Queijo parmesão	1,51
Azeite de oliva extra virgem	1,50
Açúcar	1,00
Sal	0,80
Goma guar	0,22
Manjeriço	0,15
Goma xantana	0,11
Goma carragena	0,11
Total	100,00

A primeira etapa da elaboração do produto tipo patê consistiu na fabricação do queijo quark. Para isso, foi utilizado o leite pasteurizado desnatado, aquecido em banho-maria até a temperatura de 37-38 °C em baldes previamente higienizados (18 L de leite para cada produção). Após o aquecimento, o leite foi transferido para

caixas térmicas (Invicta, Pouso Alegre, Brasil) higienizadas com capacidade para até 24 L. O cloreto de cálcio (PA, Synth, Diadema, Brasil) foi adicionado (2,50 g/10 L de leite), seguido de homogeneização e, posterior inoculação das culturas envolvidas em cada tratamento.

Após a inoculação das culturas, foi feita a mistura, deixando-se o leite em repouso, até que o pH atingisse a faixa de 6,3-6,5 (cerca de 90 minutos). Posteriormente, adicionou-se o coagulante em pó Ha-la (100% quimosina idêntica à bovina; Christian Hansen, Valinhos, Brasil) previamente diluído (0,05 g em 50 mL de água destilada autoclavada e resfriada) na proporção de 0,05 g/10 L de leite, seguido de homogeneização. Aguardou-se até que o pH diminuísse e atingisse a faixa de 5,6-5,8 (cerca de 60 minutos) para a coagulação. A coalhada obtida foi cortada em cubos, dessorada parcialmente (aproximadamente 15 minutos) e acondicionada em tecido de algodão (77 cm x 51 cm) previamente esterilizado, o qual foi colocado em câmara fria a 15 °C por 15 h, suspenso em gancho, para a dessoragem complementar.

Após a etapa de dessoragem, obteve-se a massa de queijo quark que foi transferida para um béquer previamente esterilizado, coberta com filme PVC e armazenada a 4 ± 1 °C, até que a etapa de pesagem e mistura com os demais ingredientes fosse realizada.

Durante a etapa de pesagem dos ingredientes, realizou-se, paralelamente, o branqueamento do manjeriço a 86 °C por 2 minutos e a pasteurização do tomate seco a 95 °C por 15 minutos. Esses tratamentos térmicos visaram a diminuição da carga microbiana inicial desses ingredientes, a intensificação da coloração e o amaciamento dos tecidos vegetais.

Após a pesagem dos insumos, foi realizada a etapa da mistura de todos os ingredientes do produto tipo patê em liquidificador industrial (Lucre, Catanduva, Brasil; capacidade 15 L). Finalizada a mistura, obteve-se o produto final tipo patê de textura semi-sólida. Este foi acondicionado em porções de aproximadamente 40 g em embalagens plásticas brancas de polipropileno (PP) (Tries, São Paulo, Brasil) com 68 mm de diâmetro, 32 mm de altura e volume útil de 55 mL, próprias para alimentos e previamente higienizadas. O produto foi selado com selos de alumínio (alumínio + polietileno PE), em seladora Delgo nº19 68 (Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenado sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias.

As principais etapas do fluxograma de produção do queijo quark e do produto tipo patê encontram-se esquematizadas, respectivamente, nas Figuras 1 e 2. A Figura 3 apresenta a foto do produto final acondicionado em embalagem plástica (PP).

Figura 1. Fluxograma de processamento do queijo quark para os diferentes tratamentos propostos.

Figura 2. Etapas da fabricação do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjericão e queijo parmesão, para os diferentes tratamentos propostos, após a obtenção do queijo quark.

Figura 3. Foto do produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjericão e queijo parmesão, acondicionado em embalagem plástica (PP).

3.4. Armazenamento do produto e períodos de amostragem

O produto tipo patê foi armazenado sob refrigeração (4 ± 1 °C). As determinações dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das amostras referentes a cada uma das três repetições de cada tratamento (T1, T2 e T3) foram realizadas em duplicata e a determinação do perfil de textura instrumental foi feita em quintuplicata, no dia seguinte à fabricação do produto final (dia 1) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. As análises sensoriais foram realizadas após 7, 14

e 21 dias de armazenamento, tendo em vista a estabilização dos componentes da formulação e a segurança dos consumidores. A determinação da composição centesimal do alimento foi feita em triplicata, a partir de amostras mantidas congeladas, no dia seguinte à fabricação (dia 1) do produto.

3.5. Determinação do pH

Decorridos os períodos de armazenamento sob refrigeração estipulados no item 3.4, foram realizadas as determinações de pH, em medidor de pH Thermo Orion modelo Three Stars (Thermofisher Scientific, EUA), com a utilização de um eletrodo tipo penetração 2A04 (Analyser, São Paulo, Brasil), próprio para alimentos semi-sólidos. Adicionalmente, o pH também foi monitorado durante a elaboração dos produtos, após a adição das culturas, até a faixa de pH 6,3 - 6,5, e após a adição do coagulante até a faixa de pH de 5,6 - 5,8, para posterior coagulação.

3.6. Determinação da composição centesimal do alimento

As análises de composição centesimal foram realizadas segundo a metodologia de análises físico-químicas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

- Umidade: a partir de, em média, 5 g de amostra, em estufa a vácuo (modelo 440/D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 70 °C, até obtenção de peso constante, obtido por pesagem em balança analítica (modelo AL204, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil);
- Cinzas: determinação gravimétrica através do aquecimento em mufla (modelo 1207, Forlabo, São Paulo, Brasil) de 5 g de amostra a 550 °C, por 6 h, até completa formação de cinzas (coloração acinzentada a branca);

- Proteína: determinação da quantidade de nitrogênio total, utilizando-se o método micro-Kjeldahl (300 mg de amostra), seguido da multiplicação pelo fator de conversão (6,38) para proteínas lácteas;
- Gordura: extração de lipídios com éter de petróleo a partir de amostras liofilizadas (2-3 g), utilizando-se extrator de Soxhlet;
- Carboidratos: calculado por diferença para se obter 100% da composição total.

3.7. Determinação dos parâmetros microbiológicos

3.7.1. Determinação da viabilidade da cultura *starter*, culturas probióticas e *L. sakei* 2a

As populações da cultura *starter* *Streptococcus thermophilus*, de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. foram monitoradas durante o período de armazenamento definido no item 3.4. Porções de 25 g do produto (retiradas em condições de assepsia a partir de duas amostras de mesmo lote) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” 400 (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando-se o mesmo diluente.

Para a cultura *starter* ST-M6, para os probióticos NCFM e Bb-12, e para *L. sakei* 2a, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis, com posterior adição dos meios de cultura correspondentes para o cultivo dos micro-organismos de interesse, sendo utilizada a técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*).

Para a contagem de *S. thermophilus* ST-M6, o meio de cultura utilizado foi o ágar M17 (Oxoid), fundido, resfriado a 45 °C e adicionado de uma solução estéril de lactose (Oxoid) a 10% (p/v). Após mistura e solidificação do ágar, as placas de Petri foram incubadas, em aerobiose, a 37 °C por 48 horas (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001).

Para a enumeração de *L. acidophilus* NCFM, foi utilizado o ágar de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid) formulado, modificado pela substituição de glicose 20% (p/v) por maltose 50% (p/v), de acordo com o INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1995). As placas foram incubadas a 37 °C, em aerobiose, por 48 horas, conforme descrito por VINDEROLA e REINHEIMER (1999) e SHAH (2000).

Para a contagem de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, foi utilizado o ágar MRS (Oxoid) suplementado com propionato de sódio (3 g/L) e cloreto de lítio (2 g/L) - ágar MRS-LP (LAPIERRE *et al.*, 1992). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid), conforme descrito por VINDEROLA e REINHEIMER (1999, 2000).

Para a cultura de *L. sakei* 2a, foi utilizado o ágar MRS (Oxoid) e as placas foram incubadas, em aerobiose, a 30 °C por 48 h (DE MARTINIS; FRANCO, 1998; ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2003). Apesar de *L. sakei* 2a e ST-M6 apresentarem colônias com uma morfologia semelhante, o ágar MRS utilizado para enumerar *L. sakei* 2a foi capaz de diferenciar uma cultura da outra, uma vez que ST-M6 não se multiplicou em ágar MRS a 30 °C e, da mesma forma, *L. sakei* 2a não se multiplicou em ágar M17 a 37 °C.

3.7.2. Determinação dos parâmetros microbiológicos sanitários

As populações de micro-organismos selecionados para o monitoramento de possíveis contaminações (bolores/leveduras e de coliformes totais/*E. coli*) foram determinadas durante o período de armazenamento definido no item 3.4. Para a contagem de bolores/leveduras e de coliformes totais/*E. coli*, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas PetrifilmTMEC (3M Microbiology, St. Paul, EUA), para a determinação de coliformes totais e de *Escherichia coli*, e para as placas PetrifilmTMYM (3M Microbiology), para a determinação de bolores e leveduras. As placas PetrifilmTMEC foram incubadas a 37 °C por 24 horas e as placas PetrifilmTMYM, a 25 °C por 5 dias.

Adicionalmente, a determinação da presença/ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* e a enumeração de estafilococos coagulase-positivos foram realizadas após 7 e 21 dias de armazenamento para cada tratamento (T1, T2 e T3) destinado à análise sensorial, de acordo com os padrões microbiológicos da legislação brasileira para queijos de muito alta umidade: umidade 55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, para os quais estabelece os limites permitidos para cada grupo de micro-organismos (ANVISA, 2001). Essas análises microbiológicas foram realizadas com a consultoria do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, seguindo a metodologia descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods em American Public Health Association* (DOWNES; ITO, 2001).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., porções de 25 g do produto tipo patê, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada 2% (pH 7,0 ± 0,2 a 25 °C) e incubadas a 35-37 °C durante 24

horas para etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 0,1 mL e 1 mL das diluições pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid) e 10 mL de caldo tetrationato (TT), respectivamente, e incubadas a 42 °C (RV) e a 35 °C (TT) por 24 horas para a etapa de enriquecimento. Alçadas de cada cultura de enriquecimento foram semeadas em placas contendo ágar sulfito de bismuto (SBA) (Oxoid), ágar Hektoen-Enteric (HE) (Oxoid) e ágar Rambach (RAM) (Merck) a 35-37 °C por 24 horas. Quando necessário, as colônias típicas de *Salmonella* spp. eram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para identificação (DOWNES; ITO, 2001).

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*, porções de 25 g do produto, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* e incubado a 30 °C por 24 h e 48 h. Alçadas de cada amostra foram semeadas em placas de ágar Palcam e ágar Oxford (Merck), incubadas a 35 °C por até 48 h, para, posteriormente, serem submetidas à identificação bioquímica (DOWNES; ITO, 2001).

Para pesquisa de estafilococos coagulase-positivos, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas na superfície de placas contendo ágar de Baird-Parker BD (Oxoid), adicionado de telurito de potássio 1% (10 mL/940 mL de meio) e emulsão de gema de ovo (50 mL/940 mL de meio). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas foram enumeradas e, posteriormente, submetidas à identificação bioquímica (DOWNES; ITO, 2001).

3.8. Determinação do perfil de textura instrumental

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.4, foi realizada a análise do perfil de textura instrumental das amostras de cada tratamento, através do teste de dupla penetração de, aproximadamente, 40 g de amostra armazenada em embalagens plásticas de PP, conforme descritas no item 3.3 e mantidas refrigeradas a 4 ± 1 °C até o momento da análise. Utilizou-se um dispositivo cilíndrico (*probe*) de alumínio (P25), com 25 mm de diâmetro, acoplado ao analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra), a uma velocidade de penetração e a uma profundidade de 1 mm/s e de 10 mm, respectivamente. Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro System) e a resposta gerada foi um gráfico de força (N) x tempo (s) (Figura 4). A partir da análise desse gráfico, determinaram-se os seguintes parâmetros (FOX *et al.*, 2000; KAUR *et al.*, 2009):

- Dureza: pico de força máxima durante o primeiro ciclo de compressão (primeira mordida) (força necessária para comprimir o alimento entre os dentes molares [UPRIT; MISHRA, 2004]);
- Adesividade: força necessária para a remoção do material que adere à boca durante o processo de mastigação (área negativa do gráfico);
- Elasticidade: taxa na qual o produto retorna ao seu formato original quando a força de deformação é removida do mesmo;
- Coesividade: extensão necessária para que o material seja deformado antes que ocorra a ruptura de sua estrutura, depende das forças de ligações internas do produto;

- Gomosidade: energia necessária para desintegrar um alimento semi-sólido ao ponto de ser engolido (relação direta com os parâmetros de dureza e coesividade).

Figura 4. Gráfico de perfil de textura (força em Newton x tempo em segundos) gerado pelo analisador de textura TA-XT2 para o produto tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão.

3.9. Análise sensorial

As três diferentes combinações do produto tipo patê (T1, T2 e T3) foram avaliadas sensorialmente. O protocolo seguido na análise sensorial dos produtos, descrito a seguir, incluindo o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

adotado (Anexo B), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexo A - Ofício CEP/FCF/129/2009).

Para a avaliação sensorial, as amostras do produto foram servidas em embalagens individuais devidamente higienizadas e seladas, de acordo com os períodos (dias) e as condições de armazenamento descritos no item 3.4. A escolha dos períodos para a realização das análises sensoriais teve em vista a comparação dos diferentes tratamentos estudados, em diferentes períodos de armazenamento, de acordo com o tempo necessário para a estabilização dos componentes da formulação, para uma possível comercialização, como ocorre com produtos similares disponíveis no mercado (7 dias – já que produtos semelhantes raramente são encontrados no mercado com menos de 7 dias, na cidade de São Paulo) e visando à segurança dos consumidores (máximo 21 dias), com um produto microbiologicamente seguro.

Um total de 304 consumidores adultos (provadores não treinados) saudáveis participou do presente estudo, incluindo alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da USP e outros voluntários que quiseram voluntariamente participar do estudo, e todos tinham que ser saudáveis. Em cada seção, do total de 9 realizadas (3 produtos x 3 períodos de armazenamento), foi necessária a presença de 50 consumidores diferentes para permitir uma análise estatística adequada.

Para a triagem dos consumidores, foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos; consumidor habitual de produtos lácteos, como leites, iogurtes e queijos, e de produtos à base de tomate. Já os critérios de exclusão adotados incluíram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo,

hipertiroidismo, hipertensão ou outras); estar em tratamento médico; gripado, resfriado ou indisposto e ter entrado em contato, há menos de 1 hora antes da análise, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

A avaliação sensorial foi realizada utilizando o teste de aceitabilidade, empregando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (9 pontos), não gostei e nem desgostei (5 pontos) a desgostei muitíssimo (1 ponto) (LAWLESS; HEYMANN, 1999) (modelo de ficha – Anexo C). Amostras de aproximadamente 20 g dos diferentes tratamentos (T1, T2 e T3), codificadas com números aleatórios de 3 dígitos e mantidas sob refrigeração até o momento da análise, foram oferecidas aos consumidores monadicamente.

3.10 Análise estatística

Com relação à análise estatística, utilizaram-se os softwares estatísticos XLSTAT 2011 e o MINITAB 14 para a análise dos dados. Primeiramente, aplicou-se o teste de Levene para verificar se seguiu uma distribuição normal dos dados. Quando foi constatada uma distribuição normal dos dados, a comparação dos resultados entre os diferentes tratamentos estudados para cada período de armazenamento e entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento estudado foi feita através de teste paramétrico, como a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Tukey, considerando o nível de significância de 5% (CALLEGARI-JACQUES, 2003; MORETTIN; BUSSAB, 2005; MONTGOMERY, 2005).

Quando não houve uma distribuição normal dos dados, aplicaram-se testes não-paramétricos adequados à análise, como o teste de Kruskal-Wallis, seguido do procedimento de comparação múltipla de Dunn, utilizado na comparação entre os

tratamentos. Para a comparação entre os períodos de amostragem para um mesmo tratamento, utilizou-se o teste de Friedman com a correção de Bonferroni (CONOVER, 1999; MONTGOMERY, 2005).

Para a análise sensorial, a comparação dos dados obtidos entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento e entre os períodos para um mesmo tratamento foi realizada através da ANOVA para medidas repetidas (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Para verificar se houve diferença significativa entre os gêneros na aceitabilidade do produto, aplicou-se o teste *t* de Student para amostras independentes, ao nível de significância de 5% (MONTGOMERY, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros físico-químicos

4.1.1. Composição centesimal

A composição centesimal obtida para os três tratamentos está apresentada na Tabela 3. Não houve diferença significativa na quantidade de proteínas e carboidratos presentes nas três formulações. Os produtos apresentaram, de maneira geral, valores elevados de proteína, contribuindo para o seu maior valor nutritivo.

Os tratamentos T2 e T3 apresentaram teor de cinzas significativamente maior ($p < 0,05$) que T1, apesar da quantidade de cinzas encontrada nas três formulações estar bem próxima. A percentagem de umidade foi superior ($p < 0,05$) em T3, com relação a T1 e T2. Em média, apesar da diferença significativa encontrada entre os tratamentos, a percentagem de umidade foi alta para todos os casos, o que já era

esperado, uma vez que se trata de um produto de muito alta umidade (acima de 55%), conforme classificação da ANVISA (2001).

A quantidade de gordura foi a que demonstrou a maior variação entre os tratamentos, comparada às outras análises de composição centesimal. A percentagem de gordura presente em T2 foi superior ($p<0,05$) a T1 (controle), porém os valores foram bem próximos. Já para T3, formulação suplementada com *L. sakei* 2a, a quantidade de gordura foi significativamente menor ($p<0,05$) comparada a T1 e T2, mesmo partindo-se da mesma quantidade de ingredientes adicionados aos três tratamentos.

L. sakei 2a pode ter apresentado alguma atividade lipolítica em meio lácteo, como forma de adaptação à matriz alimentícia. De acordo com MONTEL *et al.* (1998), as espécies de *Lactobacillus* são fracamente lipolíticas. Entretanto, PAPAMANOLI *et al.* (2003) demonstraram que 31% das 49 espécies de *Lactobacillus sakei* isoladas exibiram atividade lipolítica. Essa possível atividade lipolítica de *L. sakei* 2a transformaria os lipídios presentes na amostra em ácidos graxos livres e outros compostos, como o glicerol. Porém, a atividade lipolítica teria ocorrido num período curto de tempo, uma vez que as amostras foram congeladas no dia seguinte à fabricação.

Outra explicação para a menor quantidade de gordura em T3 é, possivelmente, a maior quantidade de água presente na cultura adicionada a este tratamento, uma vez que *L. sakei* 2a foi previamente ativada em caldo MRS, diferentemente dos tratamentos T1 e T2 cujas culturas foram desidratadas pelo processo de liofilização. Ainda, o creme de leite de diferentes lotes utilizado na fabricação do produto pode ter contribuído para alguma variação na gordura das amostras.

Tabela 3. Composição centesimal (média $\pm$ desvio-padrão) obtida para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a), no produto final (matéria úmida), a partir de amostras congeladas no primeiro dia de armazenamento a 4 ± 1 °C.

	Tratamentos		
	T1	T2	T3
Umidade (%)	64,26 $\pm$ 0,23 ^B	63,55 $\pm$ 0,34 ^B	65,50 $\pm$ 0,08 ^A
Cinzas (%)	2,18 $\pm$ 0,02 ^B	2,44 $\pm$ 0,01 ^A	2,47 $\pm$ 0,02 ^A
Proteína (%)	15,63 $\pm$ 0,74 ^A	15,04 $\pm$ 1,04 ^A	15,56 $\pm$ 0,47 ^A
Gordura (%)	9,01 $\pm$ 0,12 ^B	9,45 $\pm$ 0,15 ^A	6,91 $\pm$ 0,04 ^C
Carboidratos (%)	8,86 $\pm$ 0,84 ^A	9,52 $\pm$ 0,73 ^A	9,52 $\pm$ 0,45 ^A

^{A, B, C} letras sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos

4.1.2. Valores de pH

A Tabela 4 apresenta os valores de pH encontrados para o produto final, para os três tratamentos, ao longo do período de armazenamento. O pH do produto final para os tratamentos T1 e T3 se apresentou em faixas próximas, com valores significativamente superiores a T2 em todos os dias avaliados ($p < 0,05$). A comparação entre os dias mostrou uma diminuição significativa do pH para T1 na primeira semana de armazenamento ($p < 0,05$). Para os tratamentos T2 e T3, houve uma queda significativa após os 21 dias de armazenamento.

Tabela 4. Valores de pH (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos para o produto final (dia 1) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C, para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a).

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
1 ^(np)	5,01 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	4,88 $\pm$ 0,06 ^{Ba}	4,96 $\pm$ 0,02 ^{Aa}
7	4,87 $\pm$ 0,08 ^{Ab}	4,76 $\pm$ 0,07 ^{Bab}	4,90 $\pm$ 0,03 ^{Aab}
14	4,88 $\pm$ 0,10 ^{Ab}	4,77 $\pm$ 0,09 ^{Bab}	4,88 $\pm$ 0,08 ^{Aab}
21	4,88 $\pm$ 0,10 ^{Ab}	4,72 $\pm$ 0,05 ^{Bb}	4,84 $\pm$ 0,09 ^{Abc}
28	4,85 $\pm$ 0,03 ^{Ab}	4,67 $\pm$ 0,10 ^{Cb}	4,76 $\pm$ 0,06 ^{Bc}

A, B: letras sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para um mesmo dia

a, b, c: letras sobrescritas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento para um mesmo tratamento

^(np) teste não paramétrico aplicado no dia 1

A cultura NCFM adicionada em co-cultura com Bb-12 ao produto em T2 pode ter contribuído para reduzir significativamente o pH durante todos os dias de armazenamento estudados, em comparação ao *L. sakei* 2a e Bb-12 adicionados em T3 e à cultura *starter* empregada em T1, para os quais os valores de pH do produto final foram superiores em todos os períodos estudados em comparação a T2.

A diminuição de pH para os três tratamentos já era esperada, uma vez que durante a elaboração do produto, este passa por um processo fermentativo, onde a lactose presente no leite, suplementado com diferentes culturas, é metabolizada a ácido láctico. Além disso, essa redução de pH em queijos se observa ao longo do armazenamento por se tratar de um processo natural causado pela contínua produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos pelas culturas *starter* e probióticas (BURITI *et al.*, 2005b; GONCU; ALPKENT, 2005) e pode refletir nas características tecnológicas e sensoriais do produto (FOX *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2000).

A redução de pH também foi verificada em estudos com queijos Minas frescal suplementados com bactérias probióticas *Lactobacillus paracasei* ou *L. acidophilus* em co-cultura com a cultura *starter* tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) (BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b) e para queijo Minas frescal suplementado com *L. acidophilus* La-5 em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (SOUZA; SAAD, 2009). Da mesma forma, GONCU e ALPKENT (2005) observaram uma queda nos valores de pH de queijos produzidos com culturas *starter* de iogurte (*Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* + *S. salivarius* spp. *thermophilus*), culturas de queijo (cultura tipo O) ou culturas de kefir (mistura de lactobacilos, lactococos, leuconostocos, acetobactérias e leveduras).

Semelhante comportamento de pH também foi verificado para os queijos cremosos suplementados com *L. paracasei* em co-cultura com *S. thermophilus* e inulina, como também para o controle adicionado de *S. thermophilus*, desenvolvidos por BURITI *et al.* (2007a), onde houve uma redução significativa de pH entre o dia 1 e o 21º dia de armazenamento ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu para os queijos *petit-suisse* simbióticos, adicionados de mistura prebiótica e de probióticos *L. acidophilus* e *B. animalis*, cuja queda do pH foi significativa durante os 28 dias de armazenamento para todos os tratamentos (CARDARELLI *et al.*, 2008b).

4.2. Parâmetros microbiológicos

4.2.1. Populações de *Streptococcus thermophilus* ST-M6, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a

A Tabela 5 apresenta as populações das culturas de ST-M6, NCFM, Bb-12 e *L. sakei* 2a observadas para os três tratamentos (T1, T2 e T3) ao longo do armazenamento.

Tabela 5. Viabilidade (média $\pm$ desvio-padrão) de *S. thermophilus* ST-M6, *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* Bb-12 e *L. sakei* 2a durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a).

Micro-organismos	Tempo (dias)	Populações dos micro-organismos (log UFC/g)		
		Tratamentos		
		T1	T2	T3
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST-M6 (log UFC/g)	1	9,35 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	9,12 $\pm$ 0,13 ^{Ba}	9,17 $\pm$ 0,10 ^{Ba}
	7	9,22 $\pm$ 0,07 ^{Aab}	9,21 $\pm$ 0,17 ^{Aa}	9,26 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
	14	9,12 $\pm$ 0,07 ^{ABab}	9,07 $\pm$ 0,11 ^{Ba}	9,20 $\pm$ 0,13 ^{Aa}
	21	9,03 $\pm$ 0,18 ^{Bab}	9,04 $\pm$ 0,24 ^{Ba}	9,26 $\pm$ 0,17 ^{Aa}
	28	8,95 $\pm$ 0,36 ^{Bb}	9,00 $\pm$ 0,50 ^{Ba}	9,24 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM (log UFC/g)	1	-	8,50 $\pm$ 0,16 ^{ab}	-
	7	-	8,61 $\pm$ 0,23 ^a	-
	14	-	8,30 $\pm$ 0,36 ^{ab}	-
	21	-	8,16 $\pm$ 0,46 ^{ab}	-
	28	-	7,93 $\pm$ 0,93 ^b	-
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (log UFC/g)	1	-	8,43 $\pm$ 0,19 ^{Ba}	8,62 $\pm$ 0,11 ^{Aa}
	7	-	8,41 $\pm$ 0,04 ^{Bab}	8,60 $\pm$ 0,16 ^{Aa}
	14	-	8,34 $\pm$ 0,06 ^{Babc}	8,56 $\pm$ 0,09 ^{Aa}
	21	-	8,25 $\pm$ 0,07 ^{Bc}	8,58 $\pm$ 0,06 ^{Aa}
	28	-	8,26 $\pm$ 0,11 ^{Bbc}	8,54 $\pm$ 0,12 ^{Aa}
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a (log UFC/g)	1	-	-	8,18 $\pm$ 0,20 ^a
	7	-	-	8,17 $\pm$ 0,20 ^a
	14	-	-	8,10 $\pm$ 0,14 ^a
	21	-	-	8,16 $\pm$ 0,08 ^a
	28	-	-	8,11 $\pm$ 0,11 ^a

^{A, B} letras sobrescritas maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para um mesmo dia.

^{a, b, c} letras sobrescritas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento para um mesmo tratamento.

As populações de ST-M6 para os três tratamentos foram altas, na faixa de 9 log UFC/g. T1, adicionado apenas de ST-M6, apresentou viabilidade significativamente superior do micro-organismo ($p<0,05$) para o primeiro dia de armazenamento, em comparação a T2 e T3. Já para T3, após 21 dias de armazenamento, as populações foram superiores às dos demais tratamentos ($p<0,05$). As populações de ST-M6 mantiveram-se constantes ao longo do armazenamento em T2 e T3. Em contrapartida, para T1, de acordo com a análise estatística aplicada, houve uma queda significativa ($p<0,05$) da viabilidade de ST-M6 no 28º dia de armazenamento, apesar da redução da contagem de 0,40 log UFC/g do dia 1 ao dia 28 ter sido pequena e pouco relevante do ponto de vista microbiológico.

A cultura *starter* possui fácil adaptação ao meio lácteo em estudo, pois se trata de uma cultura homofermentativa, produtora de ácido láctico. É comumente utilizada como bioconservante, sendo capaz de acidificar o meio e inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos (CARMINATI *et al.*, 2001). *S. thermophilus* é utilizada na fabricação de iogurte, em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e ocupa um papel central, acelerando e conduzindo o processo fermentativo em iogurtes e em leites (CRUZ *et al.*, 2011a, b; SAAD *et al.*, 2011b).

A utilização de ST-M6 mostrou-se tecnologicamente viável e necessária para a obtenção do queijo quark nesse estudo, uma vez que acelerou o abaixamento do pH do leite e, com a adição do coagulante (quimosina), houve a desestabilização das micelas de caseína, promovendo a coagulação do leite, necessária à produção de queijo (CRUZ *et al.*, 2009).

Pesquisas têm sido realizadas com o uso da cepa de *S. thermophilus* como cultura *starter*, aplicada em co-cultura com bactérias probióticas, como é o caso de BURITI *et al.* (2007a) que adicionaram *S. thermophilus* em co-cultura com a bactéria probiótica *L. paracasei*, para a elaboração de queijo fresco cremoso potencialmente probiótico e simbiótico, sem e com inulina, respectivamente. As populações de *S. thermophilus* ficaram acima de 9,5 log UFC/g durante todo o período de armazenamento (21 dias), para ambos os queijos.

No desenvolvimento de queijo Minas frescal adicionado de *S. thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus* La-5, as populações da cultura *starter* mantiveram-se constantes ao longo do armazenamento (21 dias), na faixa de 7 log UFC/g (SOUZA; SAAD, 2009). Segundo CANDIOTI *et al.* (2002), culturas *starter*, como *S. thermophilus*, podem contribuir para o desenvolvimento de aroma e sabor em queijos durante o armazenamento, como consequência do metabolismo de carboidratos e da ação proteolítica.

Quanto às populações de Bb-12, estas foram significativamente superiores ($p < 0,05$) em T3, quando comparadas a T2, e mantiveram-se constantes ao longo do armazenamento, na faixa de 8 log UFC/g. No caso de T2, a análise estatística demonstrou uma queda significativa ($p < 0,05$) nas populações de Bb-12 ao longo do armazenamento, variando de 8,43 log UFC/g (dia 1) a 8,26 log UFC/g (dia 28), redução pouco relevante microbiologicamente, pois as variações são muito pequenas.

A maior redução da viabilidade de Bb-12 em T2 pode estar associada às menores faixas de pH encontradas para esse tratamento, em comparação a T3. Os principais fatores para a perda de viabilidade dos probióticos estão relacionados à

diminuição de pH do meio e ao acúmulo de ácidos orgânicos resultante da fermentação e da multiplicação de bactérias (SHAH *et al.*, 2000).

Apesar dessa redução, a viabilidade de Bb-12 foi elevada durante toda a vida de prateleira do produto tipo patê para ambos os tratamentos, com populações sempre acima do mínimo recomendado pela legislação, capazes de exercer o efeito benéfico à saúde desejado. A legislação recomenda a ingestão de uma porção mínima diária do alimento contendo 8 a 9 log UFC de micro-organismos probióticos, o que corresponde ao consumo de 10 g (porção sugerida de patê) do produto tipo patê contendo 7 a 8 log UFC/g.

A elevada viabilidade de Bb-12 em produtos lácteos também foi verificada por outros pesquisadores. BURITI *et al.* (2007b) produziram queijo Minas frescal suplementado com a cultura ABT, contendo as cepas probióticas *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5. As populações de Bb-12 e de La-5 mantiveram-se elevadas, acima de 1×10^6 UFC/g, durante o armazenamento (21 dias). Além disso, os autores observaram um estímulo da multiplicação de La-5. Da mesma forma, FRITZEN-FREIRE *et al.* (2010) estudaram a influência de Bb-12 nas propriedades microbiológicas, físico-químicas e reológicas de queijo Minas frescal. Segundo os autores, a adição de Bb-12 ao queijo, cujas populações variaram de 7,74 log UFC/g (dia 1) a 7,93 log UFC/g (dia 28), resultou em um produto mais firme, compacto, com grande potencial como alimento funcional e com possível aplicação industrial e comercial. Adicionalmente, queijo Cheddar foi suplementado com Bb-12 e as populações do probiótico mantiveram-se elevadas, acima de 8 log UFC/g, e constantes durante a maturação do produto pelo período de 6 meses (184 dias) a 8 °C (Mc BREARTY *et al.*, 2001).

A cultura de Bb-12 também foi incorporada em produtos não lácteos, como é o caso da sobremesa à base de arroz no sabor maçã (KAKINOKI, 2011) e em mix de açaí (VASCONCELOS, 2010). Para estes produtos, os resultados quanto à viabilidade de Bb-12 foram distintos, uma vez que as populações de Bb-12 mantiveram-se elevadas, na faixa de 8 log UFC/g, durante os 21 dias de armazenamento, para a sobremesa fermentada à base de arroz. Em contrapartida, para o mix de açaí houve uma queda da viabilidade de Bb-12 ao longo do armazenamento, com população final abaixo de 6 log UFC/g, após 84 dias de armazenamento a -18 °C, conforme observado pelo autor.

As populações de lactobacilos foram observadas em T2 e T3. A contagem de *Lactobacillus acidophilus* NCFM adicionado em T2 foi significativamente superior ($p < 0,05$), em média, no dia 7 (8,61 log UFC/g), em relação ao dia 28 (7,93 log UFC/g) (Tabela 5). A redução da viabilidade de NCFM se deve, possivelmente, às menores faixas de pH do produto, com uma queda significativa ao longo do armazenamento de T2, conforme se observou, também, para a viabilidade de Bb-12. De modo diferente, as populações de *Lactobacillus sakei* 2a em T3 mantiveram-se constantes durante todo o armazenamento, com contagens na faixa de 8 log UFC/g e população final de 8,11 log UFC/g aos 28 dias (Tabela 5).

Mesmo com uma queda significativa do 7º para o 28º dia de armazenamento para NCFM, essa redução pode ser desconsiderada em relação ao período de armazenamento total (1-28 dias) e a viabilidade de NCFM manteve-se elevada e de acordo com a recomendação mínima exigida pela legislação brasileira, uma vez que a porção diária de 10 g do produto continha uma quantidade superior a 7 log UFC/g do micro-organismo probiótico, ao longo de toda a vida de prateleira estudada. Da mesma forma, NCFM apresentou viabilidade adequada quando adicionado em co-

cultura com *S. thermophilus* em iogurte (sem adição de *L. bulgaricus*), com redução de apenas 0,5 log UFC/g durante os 28 dias de armazenamento a 4 °C (NG *et al.*, 2011). Adicionalmente, NCFM demonstrou viabilidade estável quando inoculado em leite, onde as populações mantiveram-se na faixa de 7 log UFC/mL, após 21 dias de armazenamento a 4 °C ou a 10 °C (SANDERS *et al.*, 1996). A partir desses resultados, pode-se concluir que as populações de NCFM mostram-se adequadamente estáveis em produtos lácteos.

Com relação à viabilidade de lactobacilos em co-cultura com bifidobactéria adicionados em T2 e T3, as populações mantiveram-se mais estáveis em T3, formulação suplementada com Bb-12 e *L. sakei* 2a, diferentemente de T2, cujas populações de NCFM e Bb-12 reduziram ao longo do tempo. A combinação de Bb-12 e *L. sakei* 2a em T3 resultou em um produto com maior estabilidade em termos de viabilidade celular, suplementado com uma cepa comprovadamente probiótica (Bb-12) e com outra potencialmente probiótica (*L. sakei* 2a). LEE *et al.* (2011) demonstraram que, por meio de testes *in vitro*, diversas cepas de *L. sakei* isoladas de kimchi (produto vegetal fermentado coreano) mostraram-se potencialmente probióticas.

Estudos com queijo *petit-suisse* potencialmente simbiótico adicionado de uma mistura prebiótica (contendo inulina, oligofrutose e/ou mel) resultaram em populações de *L. acidophilus* em co-cultura com *B. animalis* subsp. *lactis* acima de 6 log UFC/g e de 7 log UFC/g, respectivamente, durante o armazenamento sob refrigeração (CARDARELLI *et al.*, 2008b). Da mesma forma, PEREIRA *et al.* (2010) adicionaram *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BL04 ao queijo *petit-suisse* e obtiveram populações acima de 7 log UFC/g e de 8 log UFC/g, respectivamente, durante 28 dias de armazenamento.

Com relação à cepa de *L. sakei* 2a, esta demonstrou melhor adaptação ao meio lácteo em estudo, quando comparada ao *L. acidophilus* NCFM, o que parece ser um resultado interessante, já que a *L. sakei* 2a foi isolada de linguiça frescal, produto cárneo (matriz sólida pobre em carboidratos e rica em proteínas miofibrilares [CHAMPOMIER-VERGÈS *et al.*, 2001]) com características bem diferentes das de produtos lácteos, nos quais NCFM é comumente empregada.

As cepas de *L. sakei* são frequentemente utilizadas como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados, principalmente em linguiças, devido à sua capacidade de rapidamente fermentar os carboidratos em meio cárneo (HAMMES; HERTEL, 1998; CHAMPOMIER-VERGES *et al.*, 2001). Há, também, muitas pesquisas que avaliaram a atividade bacteriocinogênica de *L. sakei*, como é o caso de ESPÍRITO SANTO *et al.* (2003), que, a partir da fermentação de filés de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) com *L. sakei* 2a, os autores verificaram a produção de bacteriocina em diferentes concentrações de NaCl e glicose.

Apesar da maioria das pesquisas associar *L. sakei* a produtos cárneos e, mesmo a pescado, os resultados positivos obtidos neste trabalho sugerem que *L. sakei* 2a apresenta potencial para ser aplicada, também, como cultura *starter* em produtos lácteos fermentados. Adicionalmente, estudos com *L. sakei* 2a foram iniciados no nosso grupo de pesquisa visando verificar a expressão gênica de bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a em queijo *petit-suisse* sabor morango e em produto semelhante ao desenvolvido no presente trabalho, tipo patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão. Para este produto, ainda, será determinado o efeito antilisterial da bacteriocina em temperatura de refrigeração (4 °C) e em temperatura de abuso de refrigeração (15 °C).

Algumas pesquisas mostraram a adaptação de *Lactobacillus* spp., em particular, *L. acidophilus* ao meio lácteo suplementado com derivados de tomate. BABU *et al.* (1992) pesquisaram a adição de suco de tomate em leite desnatado suplementado com diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*. Os autores observaram que houve multiplicação das culturas, com populações finais na faixa de 8 – 9 log UFC/mL, resultando em maior viabilidade celular, menor tempo de geração, menor pH e maior produção de ácido. A associação de leite e de produtos derivados de tomate observada neste trabalho indicou ser benéfica à adaptação e à viabilidade de *L. acidophilus* NCFM.

Outro estudo realizado com suco de tomate fermentado por cepas de *Lactobacillus* spp., durante 72 h a 30 °C e, posteriormente, armazenado a 4 °C por até quatro semanas, demonstrou que *L. acidophilus* LA39 se multiplicou rapidamente, atingindo populações na faixa de 9 log UFC/g. Essas contagens mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento, demonstrando que essa cepa sobreviveu a baixo pH e acidez elevada (YOON *et al.*, 2004). Adicionalmente, suco de tomate fermentado a 37 °C por 80 h com *L. acidophilus* imobilizado em κ -carragena apresentou maior viabilidade (6 log UFC/mL) após 10 semanas de armazenamento a 4 °C, em comparação às células livres (4 log UFC/mL) (TSEN *et al.*, 2008).

OLIVEIRA *et al.* (2011) demonstraram que a suplementação de leite desnatado fermentado com inulina melhorou a multiplicação celular de uma mistura de probióticos contendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* e *B. lactis*. Seus valores de tempo de geração foram significativamente menores (17 – 48%), quando comparados ao estudo com essas culturas puras, adicionadas separadamente no leite. Uma das alternativas para melhorar a multiplicação de bactérias probióticas no

leite é adicionar ao produto alguns ingredientes, como o suco de tomate, açúcares simples fermentáveis, inulina, entre outros (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; STANTON *et al.*, 2003). A inulina adicionada aos tratamentos T1, T2 e T3, possivelmente, contribuiu para a elevada viabilidade de NCFM, Bb-12 e *L. sakei* 2a observada para os produtos tipo patê deste estudo.

4.2.2. Micro-organismos indicadores de contaminação

A Tabela 6 apresenta a variação das contagens de coliformes totais nos tratamentos T1, T2 e T3 durante o armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) por 28 dias. As contagens de coliformes totais foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela legislação, definido em até 3 log UFC/g (ANVISA, 2001), para todas as amostras avaliadas. Para essa mesma análise, não foram observadas colônias de *E. coli* (colônias azuis com bolhas de gás) nas amostras dos três tratamentos avaliados, resultado que confirmou a segurança microbiológica do produto aqui desenvolvido.

Tabela 6. Contagens de coliformes totais obtidas para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a) durante armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) p or até 28 dias.

Tempo (dias)	Populações de coliformes totais (log UFC/g)					
	T1		T2		T3	
	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**
1	<1	-	<1	-	<1	-
7	<1	-	1,55	<1-2,00	1,18	<1 -2,20
14	2,14	<1 -2,20	2,25	<1 -2,48	2,09	<1 -2,54
21	2,45	<1 -2,49	2,61	<1 -2,70	2,48	<1 -2,52
28	2,68	<1 -2,74	2,80	<1 -2,84	2,76	<1 -2,92

* Média das amostras positivas

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

- : sem variação

As contagens de bolores e leveduras obtidas durante os períodos de armazenamento para os tratamentos T1, T2 e T3 são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Contagens de bolores e leveduras obtidas para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a) durante armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) p or até 28 dias.

Populações de bolores e leveduras (log UFC/g)						
Tempo (dias)	T1		T2		T3	
	Média*	Variação**	Média*	Variação**	Média*	Variação**
1	1,92	<1 -2,08	2,73	2,48-2,91	2,20	<1 -2,90
7	2,59	<1 -2,66	2,97	2,90-3,05	2,84	2,50-3,00
14	3,09	2,93 -3,20	3,33	3,08-3,48	3,29	3,15-3,48
21	3,65	3,45 -3,67	3,59	3,49-3,66	3,54	3,40-3,65
28	3,71	3,50 - 3,85	3,88	3,85-3,90	3,83	3,70-3,89

* Média para as amostras positivas

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

De acordo com a legislação brasileira que estabelece os padrões microbiológicos (ANVISA, 2001), não há um limite máximo estabelecido para as contagens de bolores e leveduras conforme a classificação do produto em estudo. Com isso, pode-se assumir que as populações de bolores e leveduras obtidas durante os períodos de armazenamento para os tratamentos T1, T2 e T3 foram aceitáveis, variando de < 1 log UFC/g (dia 1) a 3,90 log UCF/g (dia 28), entre os tratamentos. As populações de bolores e leveduras foram superiores às de coliformes totais, o que já era esperado, por tratar-se de um produto lácteo adicionado de derivados de tomate (polpa de tomate + tomate seco), cujo meio é propício para o crescimento desses contaminantes.

Todos os tratamentos foram elaborados, de acordo com as normas de boas práticas de fabricação e manipulação, com amplo controle de higiene dos utensílios

e equipamentos empregados na fabricação dos produtos e da manipulação das matérias-primas utilizadas durante o processamento.

A Tabela 8 apresenta os resultados das análises de patógenos exigidas pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (ANVISA, 2001). Os resultados indicaram que, para todas as amostras avaliadas, a quantidade de micro-organismos patogênicos/contaminantes está rigorosamente de acordo com os padrões estabelecidos para queijos de muito alta umidade, com bactérias lácticas abundantes e viáveis. Como também, para outra classificação a qual o produto poderia pertencer: queijos de muito alta umidade, temperados, condimentados ou adicionados de ervas ou outros ingredientes.

Tabela 8. Determinação de micro-organismos indicadores de contaminação nos tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a), aos 7 e 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Parâmetros microbiológicos	T1		T2		T3	
	7° dia	21° dia	7° dia	21° dia	7° dia	21° dia
<i>Salmonella</i> spp.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
<i>L. monocytogenes</i>	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
Estafilococos coagulase + (UFC/g)	<100	<100	<100	<100	<100	<100

aus.: ausência em 25 g de amostra

Conforme apresentado na Tabela 8, não foi verificada a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostras para os três tratamentos aos 7 e 21 dias de armazenamento. Para a contagem de estafilococos coagulase-positivos, as populações foram menores que 100 UFC/g. Esses valores estão de acordo com a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2001), cujo limite máximo é de 1000 UFC/g de estafilococos coagulase-positivos.

4.3. Perfil de textura instrumental

A Tabela 9 apresenta os resultados dos parâmetros de textura obtidos para o produto tipo patê T1, T2 e T3 durante o armazenamento. Os valores de textura variam de acordo com a composição do leite, os micro-organismos adicionados às formulações, a presença de espessantes (gomas), de prebiótico e de frutos, como o tomate (SHAKER *et al.*, 2000; KUMAR; MISHRA, 2004). As propriedades reológicas e de textura de produtos lácteos coagulados, como os queijos, são afetadas pelas suas estruturas, uma vez que apresentam uma matriz proteica contínua com os glóbulos de gordura dispersos nesta rede (BRYANT *et al.*, 1995; KAUR *et al.*, 2009).

Os tratamentos T1 e T3 mostraram um aumento no parâmetro de dureza, o qual foi significativo em alguns períodos ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento. Já para T2, a dureza não variou significativamente. A dureza para T1 foi significativamente superior à de T3 para todos os períodos estudados, tendo sido também superior à de T2 ($p < 0,05$) a partir do 7º dia de armazenamento. T2 apresentou maior dureza ($p < 0,05$) que T3 no 1º e 14º dias de armazenamento.

Tabela 9. Perfil de textura instrumental (média $\pm$ desvio-padrão) dos tratamentos T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a) após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

Textura	Tempo (dias)	Tratamentos*		
		T1	T2	T3
Dureza (N)	1	5,09 $\pm$ 0,54 ^{Ab}	4,04 $\pm$ 0,66 ^{Aa}	3,24 $\pm$ 0,23 ^{Bd}
	7	6,90 $\pm$ 0,65 ^{Aab}	4,71 $\pm$ 1,27 ^{Ba}	3,53 $\pm$ 0,22 ^{Bcd}
	14	7,21 $\pm$ 0,59 ^{Aab}	5,08 $\pm$ 0,91 ^{Ba}	4,32 $\pm$ 0,44 ^{Cbc}
	21	8,57 $\pm$ 1,66 ^{Aa}	5,19 $\pm$ 0,82 ^{Ba}	5,32 $\pm$ 0,72 ^{Bab}
	28	8,38 $\pm$ 1,05 ^{Aa}	5,65 $\pm$ 0,99 ^{Ba}	5,63 $\pm$ 0,82 ^{Ba}
Adesividade (N.s) **	1	12,45 $\pm$ 1,90 ^{Bc}	12,45 $\pm$ 1,21 ^{Ba}	10,30 $\pm$ 0,83 ^{Cc}
	7	19,51 $\pm$ 3,09 ^{Ab}	15,55 $\pm$ 3,12 ^{Ba}	11,79 $\pm$ 0,76 ^{Ccb}
	14	20,07 $\pm$ 3,01 ^{Ab}	16,54 $\pm$ 2,20 ^{Ba}	14,02 $\pm$ 0,83 ^{Cba}
	21	22,25 $\pm$ 2,30 ^{Aba}	18,57 $\pm$ 3,11 ^{Ba}	16,00 $\pm$ 3,80 ^{Cba}
	28	23,30 $\pm$ 1,24 ^{Aa}	20,36 $\pm$ 2,79 ^{Ba}	18,29 $\pm$ 3,34 ^{Ca}
Elasticidade	1	0,884 $\pm$ 0,05 ^{Bb}	0,924 $\pm$ 0,01 ^{Aa}	0,919 $\pm$ 0,01 ^{Aa}
	7	0,930 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	0,929 $\pm$ 0,01 ^{Aa}	0,915 $\pm$ 0,01 ^{Ba}
	14	0,925 $\pm$ 0,01 ^{Aab}	0,934 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,915 $\pm$ 0,01 ^{Ba}
	21	0,939 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,932 $\pm$ 0,01 ^{Aa}	0,902 $\pm$ 0,02 ^{Ba}
	28	0,926 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	0,937 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,928 $\pm$ 0,02 ^{Aa}
Coesividade	1	0,487 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	0,519 $\pm$ 0,01 ^{Ab}	0,517 $\pm$ 0,02 ^{Aa}
	7	0,530 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,537 $\pm$ 0,01 ^{Aab}	0,508 $\pm$ 0,02 ^{Bab}
	14	0,542 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,524 $\pm$ 0,03 ^{Aab}	0,496 $\pm$ 0,02 ^{Bbc}
	21	0,531 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,549 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	0,484 $\pm$ 0,01 ^{Bbc}
	28	0,525 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,541 $\pm$ 0,02 ^{Aab}	0,475 $\pm$ 0,01 ^{Bc}
Gomosidade (N)	1	2,50 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	2,11 $\pm$ 0,37 ^{Aa}	1,61 $\pm$ 0,07 ^{Bc}
	7	3,57 $\pm$ 0,53 ^{Aa}	2,37 $\pm$ 0,49 ^{Ba}	1,75 $\pm$ 0,13 ^{Cbc}
	14	3,80 $\pm$ 0,56 ^{Aa}	2,71 $\pm$ 0,52 ^{Ba}	2,12 $\pm$ 0,28 ^{Cab}
	21	4,17 $\pm$ 0,61 ^{Aa}	2,82 $\pm$ 0,53 ^{Ba}	2,46 $\pm$ 0,33 ^{Ca}
	28	4,32 $\pm$ 0,52 ^{Aa}	3,00 $\pm$ 0,53 ^{Ba}	2,65 $\pm$ 0,42 ^{Ca}

* Médias de 15 repetições **Valores em módulo

A, B^a letras sobrescritas maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para um mesmo dia.

a, b, c^a letras sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna, para cada parâmetro de textura, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento para um mesmo tratamento.

Testes não-paramétricos aplicados na comparação entre os dias para cada tratamento: para Dureza (T1 e T3), Adesividade (T3), Elasticidade (T1), Coesividade (T2 e T3) e Gosmosidade (T3).

O aumento da dureza no alimento pode ter sido devido ao tempo de armazenamento, e, também, possivelmente, à adição de inulina. Esta fibra prebiótica tem a capacidade de se ligar às moléculas de água, formando uma rede de partículas em gel com propriedades espessantes, capazes de alterar a textura do produto (TÁRREGA; COSTELL, 2006; RENSIS; SOUZA, 2008). Essa maior dureza do produto pode, também, estar associada a uma diminuição da umidade ao longo

do tempo, conforme observado por SOUZA e SAAD (2009) para o queijo Minas frescal, consequente ao aumento de sinérese no produto.

A estabilidade da dureza é desejada ao longo do armazenamento, demonstrando que o produto após dias de conservação sob refrigeração é semelhante ao recém-fabricado, a fim de manter as características sensoriais desejadas durante toda a sua vida de prateleira (MARUYAMA *et al.*, 2006). Considerando esta afirmação, o tratamento T2 foi o que apresentou melhor dureza ao longo dos 28 dias.

A adesividade das amostras de T1 foi superior a de T3 e a de T2 após 7 dias de armazenamento. Já a de T2, foi superior a de T3 em todos os dias e, apesar do aumento (em módulo) da adesividade ao longo do tempo, este não foi significativo ($p>0,05$), demonstrando que houve uma menor variação em T2, se comparado aos demais tratamentos. Para as formulações T1 e T3, o aumento da adesividade foi significativo ao longo do armazenamento ($p<0,05$), o que demonstra uma grande variação do dia 1 ao dia 28. O resultado dessa maior adesividade implica na maior força necessária para remover o alimento que adere à boca durante a mastigação. Os desvios-padrões obtidos para alguns valores de adesividade e de dureza das amostras foram altos, possivelmente, devido à heterogeneidade do produto, por apresentar pedaços de tomate seco e de folhas de manjerição distribuídas no alimento.

A elasticidade manteve-se constante ao longo do tempo para T2 e T3 e houve um aumento significativo em T1 para os dias 1 e 21. T2 apresentou maior elasticidade ($p<0,05$) que T3 para os dias 7, 14 e 21, e em relação ao dia 1 em T1. Adicionalmente, o dia 1 em T1 foi o único período que apresentou significativamente menor elasticidade ($p<0,05$) quando comparado aos períodos estudados em T3.

Apesar dessas oscilações, os três tratamentos apresentaram valores de elasticidade semelhantes. Entretanto, os dados de elasticidade, possivelmente, não se aplicariam ao produto em estudo, uma vez que este, após sofrer a deformação, não retornou ao seu formato original em todas as amostras avaliadas, o que era esperado para a análise.

A coesividade de T1 e T2 foi superior à de T3 após o 7º dia de armazenamento. Os valores de coesividade mantiveram-se constantes em T1 ao longo da estocagem. Para T2, houve um aumento significativo do dia 1 em relação ao dia 21, mas manteve-se constante após os 28 dias avaliados. Quanto a T3, houve uma queda significativa ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento.

A gomosidade em T1 foi significativamente maior que em T2 após 7 dias de armazenamento e que em T3 para todos os dias estudados ($p < 0,05$). Não houve variação nos valores de gomosidade para T1 e T2 ao longo dos 28 dias. Já para T3, houve um aumento significativo no período estudado ($p < 0,05$), o que, possivelmente, oscilou devido ao aumento da dureza e à queda dos valores de coesividade ao longo dos 28 dias avaliados.

Considerando todos os parâmetros de textura analisados, o tratamento T2 foi o que apresentou melhor comportamento ao longo do armazenamento comparado a T1 e T3, com dados que se mantiveram constantes ao longo dos 28 dias. Dessa forma, o produto obtido em T2 foi considerado mais estável.

Na maioria dos atributos de textura avaliados, houve diferença significativa entre os tratamentos, mesmo utilizando a mesma quantidade de ingredientes para as formulações de T1, T2 e T3, variando, apenas, as culturas empregadas. Esse comportamento se deve à heterogeneidade do produto em estudo, como também as culturas empregadas em cada formulação durante a fermentação do queijo que,

possivelmente, foram capazes de interferir na textura do produto final. Além disso, os fatores como a etapa de mistura para a fabricação do produto, as diferenças nos lotes de ingredientes utilizados na preparação do mesmo e o aspecto heterogêneo do produto final contribuíram, de forma significativa, para tais resultados encontrados.

A variação de pH que ocorre durante a fabricação do queijo pode afetar a reatividade dos sítios de ligação das moléculas de caseína, o que pode influenciar na estrutura da matriz alimentar (ROWNEY *et al.*, 1999). Considerando isso, a variação de pH prevista ao longo da elaboração do queijo quark pode, possivelmente, ter afetado a estrutura do produto final e, conseqüentemente, seu perfil de textura.

Adicionalmente, há estudos que comprovam que algumas BAL, como *S. thermophilus* e lactobacilos são capazes de sintetizar exopolissacarídeos (EPS) a partir de parte do açúcar presente no alimento. Como resultado, esses EPS podem afetar as características tecnológicas de alguns produtos lácteos fermentados (leites fermentados), como a estabilidade e a textura (TAMIME, 2005; MAYO *et al.*, 2010).

As gomas, juntamente com a inulina, também exercem papel fundamental na textura dos produtos tipo patê. MARUYAMA *et al.* (2006) testaram diferentes quantidades de gomas xantana (X), carragena (C), guar (G) e de pectina (P) na preparação de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e chegaram à conclusão de que a estabilidade da textura do produto foi alcançada com a seguinte combinação de gomas: 2,5 X, 2,5 C e 5 G, que totalizam 0,75% de gomas na formulação do queijo. CARDARELLI *et al.* (2008b) observaram um aumento significativo da dureza ao longo de 28 dias de armazenamento a 4 °C para as

formulações de queijo *petit-suisse* simbiótico, adicionadas de mistura prebiótica (inulina, oligofrutose e mel) e de goma xantana como estabilizante.

De modo diferente ao observado neste presente trabalho, BURITI *et al.* (2008) obtiveram queijos frescos cremosos adicionados de *L. paracasei* em co-cultura com *S. thermophilus*, com e sem inulina, que apresentaram comportamento similar quanto ao perfil de textura para todas as formulações, inclusive o controle, ao longo dos 21 dias de armazenamento. BURITI *et al.* (2007b) também observaram que as diferentes formulações de queijos Minas frescal (T1 – cultura lática tipo O [*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*]; T2 – ácido láctico; T3 – ácido láctico e cultura ABT [La-5, Bb-12 e *S. thermophilus*]) mostraram estabilidade durante o armazenamento, mantendo valores constantes ($p > 0,05$) de dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade por até 21 dias.

Comparou-se o produto tipo patê deste estudo com cinco amostras de um produto comercial tipo *spread* (queijo cremoso com tomate seco; vida de prateleira: 3 meses), de aspecto semelhante ao aqui desenvolvido e com uma textura aerada. O produto comercial foi analisado sob as mesmas condições em texturômetro TA-XT2, porém os parâmetros de textura se comportaram de maneira diferente. Os valores, em média, da adesividade ($4,25 \pm 0,83$) em módulo, elasticidade ($0,75 \pm 0,05$), coesividade ($0,35 \pm 0,014$) e gomosidade ($1,75 \pm 0,12$) foram bem menores comparados aos valores médios encontrados para as três combinações do produto tipo patê. Para a dureza ($5,02 \pm 0,13$), a média foi similar à de T2 e T3, porém foi menor que a de T1 ao longo do armazenamento. A partir desses dados, pode-se concluir que o produto desenvolvido diferiu, de uma maneira geral, do comercial quanto aos atributos de textura instrumental.

4.4. Análise sensorial

A aceitabilidade sensorial após 7, 14 e 21 dias de armazenamento para os três tratamentos está representada na Figura 5 (escore 1 = desgostei muitíssimo; escore 5 = não gostei nem desgostei; escore 9 = gostei muitíssimo), com as médias das notas atribuídas pelos diferentes gêneros dos consumidores (sexo feminino vs. sexo masculino). Dentre os participantes da pesquisa, 55,26% foram mulheres e 44,74% homens. Não se observou diferença significativa nas notas atribuídas pelos consumidores às diferentes amostras durante os períodos de análise para cada tratamento (T1, T2 e T3). As notas médias atribuídas ao produto pelos diferentes gêneros variaram entre 6,04 (mínima atribuída pelo consumidor do sexo masculino para T1 – 14 dias) e 8,30 (máxima atribuída pelo consumidor do sexo masculino para T2 – 14 dias).

Figura 5. Médias dos escores sensoriais atribuídos pelos consumidores femininos e masculinos aos tratamentos T1, T2 e T3 nos dias 7, 14 e 21 de armazenamento a 4 ± 1 °C. As barras representam os valores médios de cada gênero, com duas unidades de desvio-padrão.

De acordo com os resultados obtidos para os diferentes gêneros, pode-se observar que não houve uma grande diferença entre as notas médias mínima (6,04) e máxima (8,30) atribuídas pelos consumidores, considerando que a escala varia de 1 a 9. Este resultado é bastante positivo e demonstra que as características sensoriais do produto foram satisfatórias.

As médias das notas atribuídas ao produto foram maiores entre os consumidores do sexo feminino (em 7 das 9 seções realizadas) em comparação aos do sexo masculino, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa ($p>0,05$) ao longo das análises (Figura 5). Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, uma vez que a média das notas atribuídas pelos consumidores, no geral, foi maior ou igual a 7 (gostei regularmente), tendo variado de 7,0 (T3 – 14 dias) a 7,5 (T2 – 7 dias), o que demonstra que o produto foi bem aceito pelos participantes da pesquisa (Figura 6) e o que leva a crer que o mesmo apresenta potencial para uma possível comercialização quanto às suas características sensoriais.

Figura 6. Média dos escores atribuídos pelos consumidores para os tratamentos T1 (controle), T2 (com *L. acidophilus* NCFM + *B. animalis* Bb-12) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a) durante 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).

Alguns comentários dos consumidores sobre o que menos gostaram nas amostras foram: falta de sal, sabor acentuado de manjeriço e presença de grumos brancos no produto derivados do queijo quark. Muitas vezes, também, foi citado sobre o aspecto do produto, como um dos atributos de que menos gostaram. Com relação aos comentários sobre o que mais gostaram nas amostras, estão incluídos: o sabor (balanceamento dos ingredientes) e a textura. A cor também foi considerada como um atributo positivo em grande parte das avaliações. No geral, a impressão global do produto foi positiva pelos consumidores.

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam as frequências das notas atribuídas pelos consumidores para as amostras T1, T2 e T3 aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento, respectivamente.

Figura 7. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a), na análise sensorial conduzida após 7 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Figura 8. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a), na análise sensorial conduzida após 14 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Figura 9. Frequência das notas obtidas para os produtos tipo patê T1 (controle), T2 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. acidophilus* NCFM) e T3 (com *B. animalis* Bb-12 + *L. sakei* 2a), na análise sensorial conduzida após 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Observando-se as figuras de frequência das notas atribuídas pelos consumidores para os diferentes períodos, nota-se que houve uma maior frequência de notas 7 e 8 atribuídas durante os 7, 14 e 21 dias estudados e a nota máxima 9,0 foi atribuída a todas as amostras de todos os tratamentos por pelo menos um dos

consumidores. No dia 7, o tratamento T1 apresentou a frequência mais alta para o escore 7 (gostei regularmente), seguido de T2 para o escore 8 (gostei muito) e de T3 também para o escore 8. Para os dias 14 e 21, T2 apresentou as frequências mais altas atribuídas ao escore 8, seguidas de T3 também para o escore 8. Com isso, pode-se observar que houve uma maior frequência de notas distribuídas entre os escores 7, 8 e 9. Apesar dessas diferenças levantadas, estas não foram significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos para um mesmo período (dia) e entre os dias para o mesmo tratamento.

Dentre as pesquisas com produtos derivados de tomate, TSEN *et al.* (2008) reportaram que o suco de tomate fermentado com *L. acidophilus* imobilizado em κ -carragena apresentou maior aceitabilidade sensorial, comparado ao suco fermentado com células livres. Segundo os autores, as notas referentes à palatabilidade foram mais altas no início do armazenamento e mantiveram-se maiores ao longo do armazenamento por até 10 semanas a 4 °C.

Dentre os alimentos do tipo *spread*, SOUZA *et al.* (2011) desenvolveram uma margarina probiótica e potencialmente simbiótica adicionada de Bb-12, cujos resultados demonstraram que a versão probiótica foi bem aceita pelos consumidores e a suplementação com inulina não interferiu na aceitabilidade do produto, com escores médios variando de 6,9 a 7,8. Adicionalmente, BURITI *et al.* (2008) desenvolveram queijo fresco cremoso probiótico e simbiótico. A análise sensorial indicou que houve maior preferência pelo queijo simbiótico, por apresentar sabor mais suave, maior cremosidade, espalhabilidade e melhor consistência, comparado ao probiótico e ao controle.

SOUZA *et al.* (2008) obtiveram maiores escores para as formulações de queijo Minas frescal suplementadas com a cepa probiótica *L. acidophilus* La-5 e com

a cultura *starter S. thermophilus*, durante 7 e 14 dias de armazenamento sob refrigeração, o que resultou na maior aceitabilidade do produto, em comparação ao controle (apenas ácido láctico), e maior estabilidade sensorial.

PEREIRA *et al.* (2010) observaram que a adição dos probióticos *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* resultou em um queijo *petit-suisse* com maior aceitabilidade sensorial, diferindo significativamente ($p < 0,05$) das formulações nas quais os probióticos foram adicionados separadamente e do controle (cultura *starter*). Da mesma forma, CARDARELLI *et al.* (2008b) também obtiveram resultados positivos suplementando o queijo *petit-suisse* probiótico com inulina e/ou oligofrutose.

ANTUNES *et al.* (2009) avaliaram a aceitabilidade de leiteiro probiótico (adição de Bb-12) em diferentes sabores (morango, baunilha, menta, graviola e cupuaçu), com a adição de sacarose ou de sucralose. Os resultados foram positivos, com notas variando de 6 a 8, em uma escala de até 9 pontos (gostei muitíssimo), para todas as amostras avaliadas.

Conforme foi observado também para as pesquisas realizadas com probióticos e/ou prebióticos relatadas anteriormente, o produto desenvolvido no presente trabalho mostrou-se sensorialmente aceitável. Além disso, o produto tipo patê apresentou populações satisfatórias das culturas probióticas e de *L. sakei* 2a que se mantiveram estáveis ao longo do armazenamento, principalmente *L. sakei* 2a em co-cultura com o probiótico Bb-12, cujas populações foram as mais elevadas durante o armazenamento para T3. Algumas características físico-químicas do produto variaram, como a redução de pH ao longo dos 28 dias para todos os tratamentos e as menores faixas de pH para T2. Com relação aos parâmetros de

textura avaliados, houve diferença significativa entre os tratamentos e T2 apresentou o produto mais estável durante o armazenamento.

Os resultados positivos obtidos para o produto tipo patê de base láctea desenvolvido só vêm a agregar no cenário atual, onde existe uma tendência das pessoas pelo maior consumo de alimentos funcionais, uma vez que a preocupação com os hábitos alimentares e com a re-educação alimentar, associada à saúde e bem-estar, é crescente. BRUHN *et al.* (2002) investigaram o interesse dos consumidores por produtos probióticos em relação às melhorias e aos benefícios que trazem à saúde e reportaram que a atitude deles em relação à adição de culturas probióticas ao alimento era positiva. Entretanto, de acordo com os mesmos autores, o público consumidor gostaria de maiores informações no rótulo do produto, referentes à frequência e à quantidade recomendada de consumo.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o produto inovador de base láctea potencialmente simbiótico foi tecnologicamente viável, com resultados satisfatórios, uma vez que a viabilidade das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifodobacterium animalis* Bb-12 foi elevada durante todo o armazenamento, como também a de *Lactobacillus sakei* 2a, que demonstrou adaptar-se à matriz láctea em estudo, com populações constantes ao longo do armazenamento e uma possível aplicação como cultura *starter* em produtos lácteos. T2 (formulação suplementada com a cultura *starter* ST-M6 e os probióticos NCFM e Bb-12) apresentou textura

mais estável ao longo do armazenamento e obteve notas médias atribuídas pelos consumidores maiores ou iguais a 7 (gostei regularmente) para todos os dias analisados, o que sugere que o produto foi sensorialmente aceito, com características sensoriais desejadas. Estes resultados indicam boas perspectivas para possível comercialização e futuras pesquisas deveriam ser feitas, a fim de investigar o potencial simbiótico do produto por meio de testes *in vitro* e ensaios clínicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Comissões de Assessoramento técnico-científico em alimentos funcionais e novos alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Lista de alegações aprovadas em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 23 out. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Resolução RDC n.2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 ago. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 20 nov. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Resolução RDC n.18, de 30 de abril de 1999a**. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 ago. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Resolução RDC n.19, de 30 de abril de 1999b**. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 ago. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 15 jul. 2011.

AMMOR, S.; RACHMAN, C.; CHAILLOU, S.; PRÉVOST, H.; DOUSSET, X.; ZAGOREC, M.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. **Food Microbiology**, v.22, n.5, p.373-382, 2005.

ANTUNES, A.E.C.; SILVA, E.R.A.; VAN DENDER, A.G.F.; MASCARA, E.T.G.; MORENO, I.; FARIA, E.V.; PADULA, M.; LERAYER, A.L.S. Probiotic buttermilk-like fermented milk product development in a semindustrial scale: physicochemical, microbiological and sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p.556-561, 2009.

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, p.669-675, 2007.

ARAI, S.; YASUOKA, A.; ABE, K. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of art. **Current Opinion in Lipidology**, v.19, n.1, p. 69-73, 2008.

ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.385-404, 2005.

AURELI, P.; FIORE, A.; SCALFARO, C.; CASALE, M.; FRANCIOSA, G. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.265-273, 2010.

BABU, V.; MITAL, B.K.; GRAG, S.K. Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, n.1, p.67-70, 1992.

BAMBIRRA, F.H.S.; LIMA, K.G.C.; FRANCO, B.D.G.M.; CARA, D.C.; NARDI, R.M.D.; BARBOSA, F.H.F.; NICOLI, J.R. Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.663-667, 2007.

BAREFOOT, S.F.; KLAENHAMMER, T.R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.1808-1815, 1983.

BELCHIOR, F. O ingrediente lácteo saudável. **Leite e Derivados**, v.13, n.76, p.54-64, 2004.

BOHM, A.; KLEESSEN, B.; HENLE, T. Effect of dry heated inulin on selected intestinal bacteria. **European Food Research and Technology**, v.222, p.737-740, 2006.

BRASIL. Portaria n.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 de maio 1999. Seção 2.

BRUHN, C.M.; BRUHN, J.C.; COTTER, A.; GARRETT, C.; KLENK, M.; POWELL, C.; STANFORD, G.; STEINBRING, Y.; WEST, E. Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.75, p.1969-1972, 2002.

BRYANT, A.; USTUNOL, Z.; STEFFE, J. Texture of cheddar cheese as influenced by fat reduction. **Journal of Food Science**, v.60, n.6, p.1216-1219, 1995.

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

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-cheeses in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.2, p.179-185, 2007b.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, v.38, p.173-180, 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, 2003. p.153-164.

CANDIOTI, M.C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S.B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C.A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, v.12, p.923-931, 2002.

CARDARELLI, H.R.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.8, p.1318-1324, 2008a.

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**, v.41, p.1037-1046, 2008b.

CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I.; GIBSON, G.R.; VULEVIC, J. Functional *petit-suisse* cheese: measure of the prebiotic effect. **Anaerobe**, v.13, n.5/6, p.200-207, 2007.

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.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGES, M.C.; CORNET, M.; CRUTZ-LE COQ, A.M.; DUDEZ, A.M.; MARTIN, V.; BEAUFILS, S.; DARBON-RONGERE, E.; BOSSY, R.; LOUX, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, v.23, p.1527–1533, 2005.

CHAMPOMIER-VERGÈS, M.-C.; CHAILLOU, S.; CORNET, M.; ZAGOREC, M. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. **Research in Microbiology**, v.152, p.839–848, 2001.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.454-460, 2007.

CONOVER, W.J. **Practical nonparametric statistics**. 3.ed. New York: John Wiley, 1999. 584p. (Wiley series in probability and statistics. Applied probability and statistics section).

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.10, p.777-788, 2005.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; FARIA, J.A.F.; CHAVES, A.C.S.D.; CARVALHO, L.M.J.; SAAD, S.M.I. Leites fermentados e iogurtes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011a. cap.12, p.271-304.

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

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Queijos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 27 capítulos, 2011b. cap.13, p.305-338.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v.40, p.951-956, 2007.

DAL BELLO, F.; WALTER, J.; HAMMES, W.P.; HERTEL, C. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. **Microbial Ecology**, v.45, p.455-463, 2003.

DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. A multiresidual method for the simultaneous determination of the main glycoalkaloids and flavonoids in fresh and processed tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by LC-DAD-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v.32, p.3664-3671, 2009.

DEEGAN, L.; POTTER, P.D.; HILL, CROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058-1071, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus sake* isolated from "linguiça fresca". **Revista de Microbiologia**, v.28, n.4, p.284-287, 1997.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.119-126, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P.; PUBLIO, M.R.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.

DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, p.564-582, 2006.

DUMAS, Y.; DADOMO, M.; DI LUCCA, G.; GROLIER, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.369-382, 2003.

ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; BEIRÃO, L.H.; SANT'ANNA, E.; DAMIAN, C.; FRANCO, B.D.G.M. Avaliação da atividade bacteriocinogênica do *Lactobacillus sakei* na fermentação da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) utilizando glicose como carboidrato fermentecível. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.1, p.83-89, 2003.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. [Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacter]. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acesso em: 30 maio 2010.

FOOD PROCESSING. **Modest growth for global probiotic market**. 2009. Disponível em: <http://www.foodprocessing.com/articles/2008/383.html>. Acesso em: 10 nov. 2011.

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

FRANCK, A. Inulin. In: STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A., eds. **Food polysaccharides and their applications**. 2.ed. Boca Raton, London: Taylor & Francis, 2006. cap.10, p.335-352. (Food science and technology)

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; PRUDÊNCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.621-627, 2010.

GAO, Y.; JIA, S.; TAN, Z. A novel bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum produced by *Lactobacillus sakei* C2. **Journal of Biotechnology**, v.136, p.S323, 2008.

GARRIGUES, C.; JOHANSEN, E.; PEDERSEN, M.B. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.9, p.2467-2468, 2010.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; VAN LOO, J.A.E.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.259-275, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. 485p.

GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, p.1767-1776, 1995.

GOH, Y.J.; KLAENHAMMER, T.R. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.15, p.5005-5012, 2010.

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.

GONCU, A.; ALPKENT, Z. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. **International Dairy Journal**, v.15, p.771-776, 2005.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, F.; AZAOLA, A.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.F.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 in kefir during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.3, p.431-436, 2010.

GORBACH, S.L. Probiotics in the third millennium. **Digestive and Liver Disease**, v.34, p.S2-S7, 2002.

GRATTEPANCHE, F.; MIESCHER-SCHWENNINGER, S.; MEILE, L.; LACROIX, C. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. **Dairy Science & Technology**, v.88, p.421-444, 2008.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Probiotics and prebiotics in the elderly. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, p.447-451, 2004.

HAMMES, W.P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v.49, p.125-138, 1998.

HANSEN, L.T.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.-L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.35-45, 2002.

HASLER, C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges – a position paper from the american council on science and health. **Journal of Nutrition**, v.132, p.3772-3781, 2002.

HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v.52, n.11, p.63-70, 1998.

HAYES, M.; COAKLEY, M.E.; O'SULLIVAN, L.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; MURPHY, J.J.; ROSS, R.P. Cheese as a delivery vehicle for probiotic and biogenic substances. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.6, n.2, p.132–141, 2006.

HELYES, L.; BRANDT, S.; RÉTI, K.; BARNA, É.; LUGASI, A. Appreciation and analysis of lycopene content of tomato. **Acta Horticulturae**, v.604, p.531-537, 2003.

HELYES, L.; LUGASI, A.; POGONYI, A.; PÉK, Z. Effect of variety and grafting on lycopene content of tomato (*Lycopersicon lycopersicum* L. karsten) fruit. **Acta Alimentaria**, v.38, p.27-34, 2009.

HERNANDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.6, p.77-84, 2005.

HOLCK, A.L.; AXELSSON, L.; HUEHNE, K.; KROECKEL, L. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. **FEMS Microbiology Letters**, v.115, p.143-149, 1994.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, n.3, p.343-362, 1995.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.L.; HUTKINS, R.W. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v.17, p.770-775, 2007.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.L.; PARKHURST, A.; HUTKINS, R.W. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v.18, p.287-293, 2008.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. **Food Microbiology**, v.19, n.5, p.519-528, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008. 1020p. Disponível em: http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em: 20 out. 2011.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented and non-fermented milk products**: detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*: culture media. Bruxelas: International Dairy Federation, 1995. [Bulletin of the IDF, 306].

JALILI, H.; RAZAVI, S.H.; SAFARI, M.; MALCATA, F.X. Enhancement of growth rate and galactosidase activity, and variation in organic acid profile of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.469-476, 2009.

JANER, C.; ARIGONI, F.; LEE, B.H.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. Enzymatic ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyse milk proteins: identification and characterization of endopeptidase O. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8460-8465, 2005.

JUSTFOOD. **Global market review of functional foods – forecasts to 2012**. 84p. 2006. Disponível em: http://www.alacrastore.com/acm/2023_sample.pdf. Acesso em: 16 nov. 2011.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.80-88, 2000.

KAKINOKI, D.M. **Desenvolvimento de sobremesa simbiótica à base de arroz**. São Paulo, 2011. 83p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KANETSKY, P.A.; GAMMON, M.D.; MANDELBLATT, J.; ZHANG, Z.F.; RAMSEY, E.; DNISTRIAN, A.; NORKUS, E.P.; WRIGHT, T.C. Dietary intake and blood levels of lycopene: association with cervical dysplasia among non-hispanic, black women. **Nutrition and Cancer**, v.31, p.31-40, 1998.

KAUR, H.; MISHRA, H.N.; KUMAR, P. Textural properties of mango soy fortified probiotic yoghurt: optimization of inoculum level of yoghurt and probiotic culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.415-424, 2009.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTEL, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103-125, 1998.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.

KUMAR, M.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; MOHANIA, D.; BEHARE, P.; VERMA, V.; KUMAR, P.; PODDAR, D.; AGGARWAL, P.K.; HENRY, C.J.K.; JAIN, S.; YADAV, H. Cancer –preventing attributes of probiotics: an update. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.61, n.5, p.473-496, 2010.

KUMAR, P.; MISHRA, H.N. Mango soy fortified set yoghurt: effect of stabilizer addition on physicochemical, sensory and textural properties. **Food Chemistry**, v.87, p.501-507, 2004.

KUTI, J.O.; KONORU, H.B. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red-ripe tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.2021-2026, 2005.

LAJOLO, F.M. Alimentos funcionais: uma visão geral. In: DE ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde**: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu, 2001. cap.33, p.173-179.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.5, p.1192-1196, 1992.

LARSEN, C.N.; NIELSEN, S.; KAESTEL, P.; BROCKMANN, E.; BENNEDSEN, M.; CHRISTENSEN, H.R.; ESKESSEN, D.C.; JACOBSEN, B.L.; MICHAELSEN, K.F. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.60, n.11, p.1284-1293, 2006.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p. (A Chapman & Hall food science book).

LEE, H.; YOON, H.; JI, Y.; KIM, H.; PARK, H.; LEE, J.; SHIN, H.; HOLZAPFEL, W. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p.155-161, 2011.

LISERRE, A.M.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged sausage. **Meat Science**, v.61, n.4, p.449-455, 2002.

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

LUCIER, G.; LIN, B.-H.; ALLSHOUSE, J.; KANTOR, L.S.; USDA. **Factors affecting tomato consumption in the United States**. Economic research service. Vegetables and Specialities, VGS-282, 2000. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/briefing/vegetables/vegpdf/TomatoConsumption.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2010.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; BÍRÓ, L.; BRANDT, S.; HELYES, L. Factors influencing lycopene content of foods, and lycopene intake of Hungarian population. **Magyar Onkologia**, v.48, n.2, p.131-136, 2004.

MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.4, p.387-396, 2007.

MARTINEZ, R.C.R.; FRANCESCHINI, S.A.; PATTÀ, M.C.; QUINTANA, S.M.; GOMES, B.C.; DE MARTINIZ, E.C.P.; REID, G. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, n.2, p.133-138, 2009.

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.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p.197-203, 2002.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M., eds. **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p.3-33.

MC BREARTY, S.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; WALLACE, J.M.; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v.11, p.599-610, 2001.

MELO, P.C.T.; VILELA, N.J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.1, p.154-157, 2005.

MONTEL, M.C.; MASSON, F.; TALON, R. Bacterial role in flavour development. **Meat Science**, v.49, p.S111-S123, 1998.

MONTES, R.G.; BAYLESS, T.M.; SAAVEDRA, J.M.; PERMAN, J.A. Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1657-1664, 1995.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 6.ed. Hoboken: John Wiley, 2005. 643p.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

MORETTIN, P.A.; BUSSAB, W.O. **Estatística básica**. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2005. 526p.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, 2008.

NG, E.W.; YEUNG, M.; TONG, P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.169-175, 2011.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, n.2, p.520-523, 2011.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, p.279-289, 2002.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v.65, n.2, p.859-867, 2003.

PARK, S.K.; PARK, D.I.; CHOI, J.S.; KANG, M.S.; PARK, J.H.; KIM, H.J.; CHO, Y.K.; SOHN, C.I.; JEON, W.K.; KIM, B.I The effect of probiotics on *Helicobacter pylori* eradication. **Hepato-Gastroenterology**, v.54, n.79, p.2032-2036, 2007.

PERAL, M.C.; MARTINEZ, M.A.; VALDEZ, J.C. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. **International Wound Journal**, v.6, n.1, p.73-81, 2009.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, C.H.B.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic *petit-suisse* cheese. **Acta Alimentaria**, v.39, n.3, p.265-276, 2010.

PEREZ-CONESA, D.; GARCIA-ALONSO, J.; GARCIA-VALVERDE, V.; INIESTA, M.D.; JACOB, K.; SANCHEZ-SILES, L.M.; ROS, G.; PERIAGO, M.J. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, p.179-188, 2009.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANÇOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.22, p.495-512, 2005.

PIEPER, J.R.; BARRETT, D.M. Effects of organic and conventional production systems on quality and nutritional parameters of processing tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.177-194, 2009.

RENSIS, C.M.V.B.; SOUZA, P.F.F. Análise sensorial de iogurtes *light* elaborados com adição de fibras de inulina e oligofrutose. **Engenharia de Alimentos/Food Engineering - FAZU em Revista**, n.5, p.68-72, 2008.

RESEARCH AND MARKETS. **Functional foods market assessment, 2007**. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/reports/461872/functional_foods_market_assessment_2007. Acesso em: 16 nov. 2011.

RESEARCH AND MARKETS. **Functional foods market assessment, 2008**. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/reports/589248/functional_foods_market_assessment_2008. Acesso em: 16 nov. 2011.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: DOWNES, F.P.; ITO K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.483-495.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofrutose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1398S-1401S, 1999.

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

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, n.8, p.276-284, 2001.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p.100-108, 2011.

ROWNEY, M.; ROUPAS, P.; HICKEY, M.W.; EVERETT, D.W. Factors affecting the functionality of mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.54, p.94-102, 1999.

RUSSO, F.; CLEMENTE, C.; LINSALATA, M.; CHILOIRO, M.; ORLANDO, A.; MARCONI, E.; CHIMIENTI, G.; RIEZZO, G. Effects of a diet with inulin-enriched pasta on gut peptides and gastric emptying rates in healthy young volunteers. **European Journal of Nutrition**, v.50, p.271-277, 2011.

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011a. cap.2, p.51-84.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011b. cap. 1, p.23-49.

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

SAARELA, M.; MAUKONEN, J.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA, T.; PATTERSON, A.J.; SCOTT, K.P.; HÄMYNEN, H.; MÄTTÖ, J. Tetracycline susceptibility of the ingested *Lactobacillus acidophilus* LaCH-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12 strains during antibiotic/probiotic intervention. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p.271-280, 2007.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VAARI, A.; SUOMALAINEN, T.; MÄTTÖ, J. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.6, p.1330-1339, 2005.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.L.; SIGVART-MATTILA, P.; MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v.16, n.12, p.1477-1482, 2006.

SALGADO, J.M.; ALMEIDA, M.A. Mercado de alimentos funcionais: desafios e tendências. **Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais**, p.8, 2008.

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.

SANDERS, M.E.; MARCO, M.L. Food formats for effective delivery of probiotics. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, p.65-85, 2010.

SANDERS, M.E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.S58-S61, 2008.

SANDERS, M.E.; WALKER, D.C.; WALKER, K.M.; AOYAMA, K.; KLAENHAMMER, T.R. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.943-955, 1996.

SANDRAZ, M.H. Fromage frais: le bénéfice de l'innovation. **Revue Laitiere Française**, n.486, p.26-30, 1989.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M.D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, n.1/2, p.125-136, 2002.

SAXELIN, M. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market and changes in the market place: a european perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.S76-S79, 2008.

SCHOUTEN, B.; VAN ESCH, B.C.A.M.; HOFMAN, G.A.; VAN DOORN, S.A.C.M.; KNOL, J.; NAUTA, A.J.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L.E.M.; KNIPPELS, L.M.J. Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. **Journal of Nutrition**, v.139, n.7, p.1398-1403, 2009.

SENOK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; BOTTA, G.A. Probiotics: facts and myths. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.12, p.958-966, 2005.

SENÑORANS, F.J.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. New trends in food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.5, p.507-526, 2003.

SEVERIN, S.; XIA, W.S. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.7/8, p.645-656, 2005.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

SHAH, N.P. Probiotics and prebiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.15, p.13-16, 2004.

SHAKER, R.R.; JUMAH, R.Y.; ABUJDAYIL, B. Rheological properties of plain yoghurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. **Journal of Food Engineering**, v.44, p.175-180, 2000.

SHARP, M.D.; McMAHON, D.J.; BROADBENT, J.R. Comparative evaluation of yogurt and low-fat cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. **Journal of Food Science**, v.73, n.7, p.M375-M377, 2008.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B., orgs. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 168p.

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 Technology**, v.43, p.871-877, 2008.

SOUZA, C.H.B.; GIOIELLI, L.A.; SAAD, S.M.I. Effect of inulin and milk-derived components (caseinomacropeptide and whey protein concentrate) on sensory acceptance of probiotic and synbiotic margarine. In: PANGBORN SENSORY SCIENCE SYMPOSIUM, 9, Toronto, 2011. **Conference Proceedings**. New York: Elsevier, 2011. Abstr.P2.2.24, 1CD.

SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.633-640, 2009.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R. (ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton, EUA: CRC Press, 2003, p. 27-58.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.198-203, 2005.

SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an *in vivo* murine model. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.6, p.2392-2400, 2007.

TAMIME, A.Y. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell, 2005. v.1, 216p.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. **International Dairy Journal**, v.16, p.1104-1112, 2006.

THEBAUDIN, J.Y.; LEFEBVRE, A.C.; HARRINGTON, M.E.; BOURGOIS, C.M. Dietary fibres: nutritional and technological interest. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.2, p.41-48, 1997.

TOMATOLAND. **All about processed tomatoes – global processing tomato volumes, 2008**. Disponível em: <http://www.tomatoland.com>. Acesso em: 12 out. 2011.

TSEN, J.-H.; LIN, Y.-P.; HUANG, H.-Y.; KING, V.A.-E. Studies on the fermentation of tomato juice by using κ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.32, p.178-189, 2008.

UPRIT, S.; MISHRA, N.H. Instrumental texture profile analysis of soy fortified pressed chilled acid coagulated curd (Paneer). **International Journal of Food Properties**, v.7, p.367-378, 2004.

VARCOE, J.; ZOOK, C.; SUI, J.; LEIGHTON, S.; BUSTA, F.; BRADY, L. Variable response to exogenous *Lactobacillus acidophilus* NCFM consumed in different delivery vehicles. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.5, p.900-906, 2002.

VASCONCELOS, B.G. **Desenvolvimento de mix de açaí probiótico, prebiótico e simbiótico**. São Paulo, 2010. 43p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, p.497-505, 1999.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v.36, p.895-904, 2003.

WILDT, S.; MUNCK, L.K.; VINTER-JENSEN, L.; HANSEN, B.F.; NORDGAARD-LASSEN, I.; CHRISTENSEN, S.; AVNSTROEM, S.; RASMUSSEN, S.N.; RUMESSEN, J.J. Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.12, n.5, p.395-401, 2006.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p.315-318, 2004.

ZHAI, Z.; HAO, Y.; YIN, S.; LUAN, C.; ZHANG, L.; ZHAO, L.; CHEN, D.; WANG, O.; LUO, Y. Characterization of a novel rolling-circle replication plasmid pYSI8 from *Lactobacillus sakei* YSI8. **Plasmid**, v.62, p.30-34, 2009.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/129/2009
Protocolo CEP/FCF/528
CAAE:0028.0.018.000-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Desenvolvimento de patê de base láctea simbiótico
Pesquisador Responsável:	Cristina Dini Staliano
Orientador:	Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	FAPESP/CAPES

II - Sumário Geral do Protocolo:

O presente projeto tem como objetivo desenvolver um patê simbiótico à base de queijo quark no sabor tomate com manjerição e queijo parmesão. Serão testados três diferentes tratamentos, todos eles suplementados com inulina. Amostras dos três tratamentos do patê serão armazenadas a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 21 ou, se o produto mostrar condições satisfatórias, até 28 dias. Ao longo desse período avaliar-se-ão as características microbiológicas, o perfil de textura instrumental e o pH do produto. Os produtos também serão comparados sensorialmente em 3 períodos distintos de armazenamento (após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$). Adicionalmente, será realizada a determinação da composição centesimal (umidade, gordura, proteínas e cinzas) do produto, a partir de amostras congeladas no dia seguinte à sua elaboração.

Os objetivos do presente estudo são:

- Desenvolver novo produto salgado simbiótico tipo patê de base láctea (queijo quark), sabor tomate com manjerição e queijo parmesão;
- Avaliar o produto final e seu comportamento e estabilidade durante o armazenamento sob refrigeração a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por até 21 ou 28 dias, quanto ao seu potencial simbiótico e de mercado;
- Verificar a viabilidade e a possível adaptação ao meio lácteo de *Lactobacillus sakei* 2a no patê de base láctea, sabor tomate com manjerição e queijo parmesão, associado a uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12;
- Verificar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em meio com prevalência de sal, associados à cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus*;
- Avaliar a aceitabilidade do produto sob o ponto de vista sensorial e suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura instrumental, durante o seu armazenamento sob refrigeração a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por até 21 ou 28 dias.

Tipo de estudo: Transversal

Descrição da Casuística:

Três diferentes formulações de patê de base láctea serão estudadas (F1, F2 e F3). As amostras serão servidas em potes devidamente higienizados e selados, em 3 períodos distintos (7, 14 e 21 dias) de armazenamento refrigerado a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A escolha dos períodos para a realização das análises sensoriais tem em vista a comparação dos diferentes patês a serem estudados em diferentes períodos de armazenamento, de acordo com o tempo necessário para a estabilização dos componentes da formulação para uma possível comercialização de produtos similares disponíveis no comércio (7 dias) e visando a segurança dos provadores (máximo 21 dias).

Participarão deste estudo de 50 até, no máximo, 450 voluntários adultos (provadores não treinados). Esse número de provadores – de 50 a 450 – poderá variar em função da

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

possibilidade de um mesmo provador participar de diferentes seções da análise sensorial. Em cada seção será necessária a presença de 50 provadores diferentes para permitir uma análise estatística adequada. Se os 50 provadores participassem todos das 9 seções de análise sensorial (3 produtos x 3 períodos de armazenamento), seriam apenas 50 provadores, no total. Caso cada provador participe apenas de uma única seção, participariam 450 voluntários, ou seja, 50 provadores x 9 seções. Sendo assim, o número de provadores é um número intermediário entre 50 e 450 provadores.

Essa avaliação sensorial será realizada através de teste de aceitabilidade, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos, com variação de gostei muitíssimo (9 pontos), não gostei e nem desgostei (5 pontos) e desgostei muitíssimo (1 ponto) (Lawless & Heymann, 1999). Amostras de aproximadamente 20 g das diferentes formulações (F1, F2 e F3), codificadas com números aleatórios de 3 dígitos, serão oferecidas aos provadores monadicamente.

A comparação dos dados obtidos entre os patês para os diferentes dias de armazenamento e diferentes formulações será realizada através da análise de variância (ANOVA), com a utilização do teste de Tukey, considerando-se o nível de significância $p < 0,05$ (Callegari-Jacques, 2003).

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Os voluntários devem ser saudáveis, podendo ser alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários que queiram participar do estudo. Para a triagem dos provadores, serão aplicados os critérios de inclusão, a saber: possuir entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos; ser consumidor habitual de produtos lácteos, como leites, iogurtes e queijos, e de produtos à base de tomate.

Serão critérios de exclusão:

Os critérios de exclusão a serem adotados incluirão: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar em tratamento médico; estar gripado, resfriado ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

III – Situação do Protocolo: APROVADO *ad referendum* em 08/10/2009.

São Paulo 08 de outubro de 2009.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome do Provedor: Data de Nascimento:/...../.....
Documento de Identidade nº: Órgão emissor: Sexo: () M () F
Endereço: nº: Apto:
Bairro: Cidade: CEP:
Endereço eletrônico (e-mail): Telefone:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: **Desenvolvimento de patê de base láctea simbiótico**
2. Pesquisador: **Cristina Dini Staliano**
3. Cargo/Função: **mestranda**
Departamento da FCF/USP: **Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**
4. Avaliação do Risco da pesquisa: Risco Mínimo (X) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()
5. Duração da Pesquisa: **2 anos (análise sensorial – 1 ano)**

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PROVEDOR OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Justificativa, objetivos e procedimentos

Você está sendo convidado a participar da análise sensorial de um produto salgado tipo “patê” de base láctea sabor tomate com manjeriço e queijo parmesão. Este produto tem como característica, além da presença de leite e de tomate como principais matérias-primas, microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto e fibra prebiótica inulina que estimula o crescimento e/ou atividade destes microrganismos. O tomate adicionado ao produto para conferir sabor é fonte de licopeno, pigmento que confere a cor vermelha característica do fruto maduro, possui potencial antioxidante e reduz a incidência de alguns tipos de câncer. O desenvolvimento do patê é feito pela mestranda Cristina Dini Staliano (Engenheira de Alimentos), sob orientação da Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad. 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. O número mínimo de voluntários para esta análise sensorial é de 50 provedores. Caso você tenha interesse em participar, acomode-se junto a uma das cabines do Laboratório de Análise Sensorial (B16).

O produto a ser avaliado nesta análise possui em sua formulação: leite, creme de leite, polpa de tomate, manjeriço, sal, açúcar, azeite de oliva, gomas, queijo parmesão, inulina e microrganismos que contribuem com a função intestinal e/ou fermentam o produto (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus sakei* 2a). Todos os ingredientes da formulação são utilizados em produtos disponíveis para consumo humano, ou seja, são de grau alimentício.

Para participar desta análise, você: deve ter entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, gostar de produtos lácteos, tais como iogurtes, queijos e bebidas lácteas e produtos à base de tomate, tais como molhos, extratos de tomate, *catchups* e suco de tomate e ser consumidor regular dos mesmos. Você não deve participar se possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância ou outro tipo de restrição, como doença crônica (diabetes, hipertensão, hipo ou hipertireoidismo) ou tratamento médico (em uso de medicamentos que podem interagir com os ingredientes); não deve estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato há menos de 1 hora com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte. Nessas condições, você não poderá participar da análise sensorial do produto.

Em cada comparecimento (até 9), você receberá uma amostra e uma ficha de avaliação. No total, 3 tipos de produtos estão sendo testados. A amostra contém aproximadamente 20 g, apresentada em uma consistência cremosa. Prove a amostra e registre na ficha sua opinião com relação ao produto de uma maneira geral fazendo um “x” em um lugar na escala de 1 a 9, onde, 1 = desgostei muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo. Em seguida, escreva o que você mais gostou e o que menos gostou na amostra.

Desconfortos e riscos

Os riscos de sua participação neste estudo são mínimos. Não foram encontradas evidências de risco ou desconforto relacionado à análise sensorial em estudos deste tipo. Pelo fato do patê possuir, em sua composição, microrganismos que auxiliam na função intestinal e derivados de leite e de tomate, que são ingredientes reconhecidamente seguros, os possíveis desconfortos (flatulência e dores abdominais) são mínimos.

Benefícios esperados

Não há nenhum benefício direto. Porém, você contribuirá para o desenvolvimento de alimentos com características sensoriais adequadas às expectativas de futuros consumidores.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Caso você não queira continuar participando da pesquisa, a qualquer momento você pode desistir, sem que haja qualquer penalidade. Havendo qualquer dúvida com relação aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa você deve comunicar ao grupo de pesquisa a qualquer momento. É assegurado que todas as informações pessoais serão confidenciais, o sigilo e privacidade também são garantidos, mesmo que os resultados sejam publicados em periódicos científicos.

Não haverá remuneração financeira aos participantes das análises sensoriais.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Cristina Dini Staliano e Susana Marta Isay Saad.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Av. Prof. Lineu Prestes, 580
CEP 05508-000 São Paulo-SP.
Telefone: (11) 3091-2379

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

“Estou ciente do objetivo do teste, sou consumidor de produtos à base de leite e de tomate, não apresento reação alérgica ou intolerância aos ingredientes, tenho entre 18 e 60 anos, não tenho nenhuma doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras), não estou fazendo tratamento médico (tomando algum medicamento) e aceito participar dessa análise.”

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador
Cristina Dini Staliano

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13A
CEP 05508-900 São Paulo – SP
(11) 3091-3677 - cepfcf@usp.br

ANEXO C – Ficha para teste de aceitação utilizada na análise sensorial

**Ficha para teste de aceitação – produto salgado tipo “patê” de base láctea
sabor tomate com manjerição e queijo parmesão**

Nome: _____ Data: ____/____/____

Amostra: _____

Você recebeu uma amostra de um produto salgado tipo “patê” de base láctea sabor tomate com manjerição e queijo parmesão. Por favor, prove a amostra e avalie de maneira geral (aparência, sabor e textura) usando a escala abaixo o seu grau de aceitação relacionado ao produto.

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

Cite a característica que você **mais** gostou na amostra: ☺

Cite a característica que você **menos** gostou na amostra: ☹

Obrigado pela participação!

ANEXO D – Laudos de análises referentes aos parâmetros microbiológicos sanitários das amostras

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 75/11

AMOSTRA: T1 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjeriço e queijo parmesão formulação 1 - 7 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 25/05/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 07/06/11

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

DATA DE ANÁLISE: 25/05/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 160 gramas, estava acondicionada em pote plástico e identificada como: Fabricação: 11/05/2011; Validade: 08/06/2011.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Mariza Landgraf

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 76/11

AMOSTRA: T2 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjerição e queijo parmesão formulação 2 - 7 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 25/05/11

DATA DE ANÁLISE: 25/05/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 07/06/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 153 gramas, estava acondicionada em pote plástico e identificada como: Fabricação: 27/04/2011; Validade: 25/05/2011.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Prof. Dra. Mariza Landgraf

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 77/11

AMOSTRA: T3 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjerição e
queijo parmesão formulação 3 – 7 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 25/05/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 07/06/11

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

DATA DE ANÁLISE: 25/05/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 117 gramas, estava acondicionada em pote plástico e identificada como: Fabricação: 05/05/2011; Validade: 02/06/2011.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Mariza Landgraf

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 84/11

AMOSTRA: T1 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjeriço e queijo parmesão formulação 1 com 21 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 08/06/11

DATA DE ANÁLISE: 08/06/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 27/06/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 118 gramas, estava acondicionada em pote plástico e identificada como: Fabricação: 11/05/2011; Validade: 08/06/2011.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Prof. Dra. Mariza Landgraf

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 92/11

AMOSTRA: T2 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjerição e queijo parmesão formulação 21 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 25/05/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 12/07/11

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

DATA DE ANÁLISE: 05/07/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 130 gramas, estava acondicionada em pote plástico.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Mariza Landgraf

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

LAUDO: 85/11

AMOSTRA: T3 – Produto tipo patê de base láctea sabor tomate com manjerição e queijo parmesão formulação 3 com 21 dias

INTERESSADO: Profa. Dra. Susana Saad

DATA DE RECEBIMENTO: 08/06/11

DATA DE ANÁLISE: 08/06/11

DATA DE EXPEDIÇÃO: 27/06/11

TIPO DE EXAME: Microbiológico

RESPONSÁVEL: M. Landgraf / M. T. Destro

1. METODOLOGIA

A amostra foi examinada segundo metodologia descrita em American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. eds, 4th ed., 2001, 676p.

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	VALORES
Contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)*	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	AUSÊNCIA
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	AUSÊNCIA

* Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. COMENTÁRIOS

A amostra, composta de aproximadamente 135 gramas, estava acondicionada em pote plástico e identificada como: Fabricação: 05/05/2011; Validade: 02/06/2011.

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados desta análise têm valor restrito e se aplicam tão somente à amostra enviada pelo interessado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e não refletem, necessariamente, as opiniões da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Mariza Landgraf