UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

Queijo *petit-suisse* probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro*.

Marina Padilha

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

Queijo *petit-suisse* probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro*.

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Marina Padilha

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

<p>Padilha, Marina</p> <p>P123q Queijo <i>petit-suisse</i> probiótico e simbiótico : características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência <i>in vitro</i> / Marina Padilha. -- São Paulo, 2013.</p> <p>122p</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico -Farmacêutica.</p> <p>Orientador: Saad, Susana Marta Isay</p> <p>1. Microbiologia de alimentos 2. Probióticos I. T. II. Saad, Susana Marta Isay, orientador.</p> <p>664.07 CDD</p>
--

Marina Padilha

Queijo *petit-suisse* probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro*.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
FCF/USP
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer
ICB/USP

Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza
FCF/USP

Aprovado em: 28 de maio de 2013.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Eder e Shirley, à minha irmã, Marisa, ao meu noivo, Diego, com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, pela proteção e orientação em meu caminho.

Aos meus pais, Eder e Shirley, e à minha irmã, Marisa que com carinho e amor não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu eterno companheiro, Diego, pelo carinho, amor, incentivo e compreensão em todas as horas, além da assessoria especial nas análises de gráficos e cálculos. Agradeço por você, Mel e Amora serem o ninho que me recebe com alegria e conforto, todos os dias.

À minha orientadora Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad, pelo privilégio de seus ensinamentos, pela paciência e oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa.

À Dra Martha Lisette Villarreal Morales, pela importante colaboração neste trabalho, dedicação, paciência e pelo desfrute de sua maravilhosa companhia ao longo destes dois anos.

À Dra Raquel Bedani, quem por tantas vezes me ouviu e aconselhou com discernimento.

Aos queridos amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e aos companheiros de trabalho, Natália, Graziela, Clara, Cristina, Gabriela, Marina, Carol, pela agradável convivência, em especial, ao Diogo, Mayra e Felipe com quem pude contar em, absolutamente, todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Mestrado (processo 2011/05203-1) e pelos Auxílios à Pesquisa concedidos (processos 09/52600-6 e 12/13535-7).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa no início do Mestrado e auxílio financeiro através da verba PROAP.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF-USP, em especial ao Alexandre Mariani, pelo auxílio na realização de análises e à funcionária Leila Aparecida Bonadio, pelas revisões bibliográficas.

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

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro Deus lá dentro”.

Albert Einstein

RESUMO

PADILHA, M. **Queijo *petit-suisse* probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro***. 2013. 122 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a sobrevivência de cepas probióticas incorporadas em queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e simbiótico no produto armazenado por até 28 dias e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no trato gastrointestinal, utilizando-se métodos independentes de cultivo, paralelamente aos métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo, bem como avaliar características tecnológicas dos queijos elaborados. O delineamento experimental constituiu-se de 3 tratamentos de queijo *petit-suisse*: QP = queijo probiótico (com cultura ABT-4, composta por *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e da cultura *starter* *Streptococcus thermophilus*); QS = queijo simbiótico, contendo os probióticos e prebióticos (cultura ABT-4 + inulina e fruto-oligossacarídeo) e QC = queijo controle, elaborado apenas com uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus*. Os queijos foram armazenados a 4 °C e as análises foram realizadas semanalmente, por 28 dias. A contagem dos micro-organismos probióticos foi realizada por técnicas independentes (q PCR) e dependentes de cultivo. Adicionalmente, foi monitorada a presença de contaminantes e avaliadas a aceitabilidade sensorial e a textura instrumental dos produtos ao longo de seu armazenamento. Os queijos *petit-suisse* apresentaram populações de *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* BB-12 superiores a 7 log UFC/g, até o 28º dia de armazenamento. Em QS, observou-se maior estabilidade da população de *L. acidophilus* LA-5, ao longo do armazenamento e maior sobrevivência *in vitro* de *B. animalis* BB-12, até 14 dias de armazenamento ($p < 0,05$), com taxas médias de sobrevivência diminuindo de 88,0% (dia 1) para 59,6% (dia 28) em QS e de 80,0% (dia 1) para 59,8 (dia 28) em QP. Em contrapartida, para *L. acidophilus* LA-5, as taxas médias de sobrevivência diminuíram de 49,1% (dia 1) para 36,9% (dia 28) em QS e de 61,6% (dia 1) para 39,2% (dia 28) em QP, e foram maiores em QP nos dias 1 e 14 ($p < 0,05$). A adição de probióticos no queijo *petit-suisse* resultou em influência significativa nos parâmetros de textura, com uma diminuição da dureza, o que provavelmente contribuiu para maiores escores de aceitabilidade, nas formulações com probióticos ($> 5,9$), em relação ao produto controle ($< 5,3$). Adicionalmente, houve influência positiva da mistura prebiótica na aceitabilidade de QS (escore = 6,8), aos 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Entre os métodos utilizados para a quantificação de micro-organismos, os valores obtidos através dos métodos convencional e q PCR foram semelhantes, porém observou-se uma tendência a superestimar a população dos micro-organismos, no método de q PCR. No ensaio de sobrevivência *in vitro*, observou-se valores semelhantes e um coeficiente de correlação de Pearson de 0,92 entre os métodos de q PCR com *Propidium Monoazide* (PMA) e convencional, para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, enquanto que para *L. acidophilus* LA-5, os resultados mostraram-se promissores, particularmente na quantificação de células viáveis, porém não cultiváveis. Os resultados obtidos sugerem que a formulação QS foi a mais favorável em termos de estabilidade e sobrevivência dos probióticos, além de apresentar a melhor aceitabilidade aos 21 dias de armazenamento. Em relação aos métodos de quantificação, técnicas moleculares mostraram-se mais adequadas, particularmente com a utilização de PMA, embora requeiram otimizações.

Palavras-chave: probióticos, prebióticos, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

PADILHA, M. **Probiotic and synbiotic *petit-suisse*: technological features and use of culture dependent and independent methods for the evaluation of probiotic survival in the product and in *in vitro* survival assays**. 2013. 122 p. Dissertation (Master of Science)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

This study aimed to evaluate the survival of probiotic strains incorporated into *petit-suisse* cheese in the product stored for up to 28 days and under *in vitro* gastrointestinal tract simulated resistance assay, using culture-independent and culture-dependent methods. Furthermore, sensory acceptability and instrumental texture of the cheeses studied were evaluated. Experimental design involved the evaluation of three trials of *petit-suisse* cheese, as follows: PC = probiotic cheese (with the ABT-4 culture, containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, and *Streptococcus thermophilus*, as starter culture), SC = synbiotic cheese, containing both the probiotics and the prebiotics (with the ABT-4 culture + inulin and fructooligosaccharides), and CC = control cheese (containing only the starter culture of *Streptococcus thermophilus*). Cheeses were stored at 4°C and the microbial counts in the products, as well as the *in vitro* survival assays were conducted weekly up to the 28th day. The probiotic counts in the product and in the *in vitro* assays were conducted through culture-independent (qPCR) and dependent methods. Additionally, the presence of contaminants was monitored and the sensory acceptability and instrumental texture of the products were evaluated during storage at 4°C. The *petit-suisse* cheeses presented *L. acidophilus* LA-5 and *B. animalis* BB-12 populations above 7 log CFU/g, up to the 28th day of storage. For SC, a higher *L. acidophilus* LA 5 population stability during the shelf-life and a higher *B. animalis* BB-12 *in vitro* survival up to 14 days of storage ($p < 0.05$) were observed. BB-12 presented mean survival rates decreasing from 88.0% (day 1) to 59.6% (day 28) in SC and from 80.0% (day 1) to 59.8% (day 28) in PC. In contrast, for *L. acidophilus* LA-5, the mean survival rates decreased from 49.1% (day 1) to 36.8% (day 28) in SC and from 61.6% (day 1) to 39.2% (day 28) in PC, which presented higher survival rate on days 1 and 14 ($p < 0.05$). The addition of probiotics in *petit-suisse* cheese influenced texture parameters significantly, leading to decreased hardness ($p < 0.05$), which probably contributed for the higher acceptability scores of both cheeses supplemented with probiotics (> 5.9), compared to the control product (< 5.3). Additionally, there was a positive influence of the prebiotic mixture on the SC acceptability (score = 6.8) on day 21 of storage ($p < 0.05$). Regarding the methods used for the enumeration of microorganisms, the results for the qPCR and the conventional method were quite similar. However, a trend towards overestimating microbial populations with the qPCR method was observed. For the *in vitro* survival assays, we observed similar results for the qPCR method with Propidium Monoazide (PMA) and the conventional method for *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 and a Pearson correlation coefficient of 0.92, whereas for *L. acidophilus* LA-5, the results were promising, especially in the quantification of viable, but not cultivable cells. The results suggest that the synbiotic cheese was the most favorable in terms of stability and probiotics survival, besides presenting the highest acceptance at 21 days of storage. Regarding quantification methods, molecular techniques have proved to be more suitable, particularly with PMA, but an optimization is required.

Key words: probiotics, prebiotics *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, real time polymerase chain reaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis empregadas na elaboração dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados.	40
Tabela 2. Ingredientes utilizados na elaboração de queijo <i>petit-suisse</i> e respectivas proporções (queijo <i>petit-suisse</i> QP = probiótico; QS = simbiótico; QC = controle)...	42
Tabela 3. Condições de cultivo empregadas para as análises microbiológicas por métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo.	47
Tabela 4. Lista de <i>primers</i> utilizados no método de quantificação por técnica independente de cultivo (qPCR).....	49
Tabela 5. Condições utilizadas nas reações de qPCR para a quantificação dos micro-organismos.	50
Tabela 6. Valores de pH do queijo <i>petit-suisse</i> controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante o período de armazenamento a 4 °C.	57
Tabela 7. Composição centesimal e valor energético das formulações QC (queijo controle), QP (queijo probiótico) e QS (queijo simbiótico).	61
Tabela 8. Perfil de textura instrumental dos queijos QC, QP e QS, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, sob refrigeração a 4 °C.....	62
Tabela 9. Escores de aceitabilidade para as formulações QC (queijo controle), QP (queijo probiótico) e QS (queijo simbiótico), após 7, 14 e 21 dias de armazenamento.	66
Tabela 10. Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 e <i>Streptococcus thermophilus</i> (log UFC/g) em formulações de queijo <i>petit-suisse</i> probiótico (QP), simbiótico (QS) e controle (QC), armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Quantificação por meio de método dependente de cultivo, por semeadura em ágar seletivo.	70

Tabela 11. Valores referentes à contagem de coliformes totais, obtidos para as formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante armazenamento refrigerado a 4 °C por até 28 dias.....78

Tabela 12. Valores referentes à contagem de leveduras, obtidos para as formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante armazenamento refrigerado a 4 °C por até 28 dias.....78

Tabela 13. Pesquisa de patógenos nas formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), ao 1º dia de armazenamento.79

Tabela 14. Taxa de sobrevivência (%) de *L. acidophilus* LA-5 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, nas formulações de queijo *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante período de armazenamento a 4 °C, de acordo com valores obtidos no método convencional de semeadura em ágar seletivo.83

Tabela 15. Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, nas formulações de queijo *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante período de armazenamento a 4 °C, de acordo com valores obtidos no método convencional de semeadura em ágar seletivo.83

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Fluxograma de processamento empregado para a obtenção da massa-base de queijo *quark*.43
- Figura 2.** Fluxograma de processamento empregado para a obtenção de queijo *petit-suisse*, a partir da massa-base de queijo *quark*.44
- Figura 3.** Número de citações de atributos positivos e negativos mencionados pelos provadores, considerando todo período de armazenamento e todas as formulações de queijo *petit-suisse* estudadas. Os números nas barras correspondem ao número de vezes que o atributo foi citado.....69
- Figura 4.** Viabilidade de *L. acidophilus* LA-5 (i), *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (ii) e *S. thermophilus* (iii), quantificada pelos métodos de semeadura em ágar seletivo e qPCR sem PMA nas formulações de queijo *petit-suisse* estudadas, durante 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.....74
- Figura 5.** Sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) durante o armazenamento por 1, 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii, iv e v, respectivamente) antes e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástrica, após 2 horas e entérica, após 4 horas e 6 horas de ensaio.81
- Figura 6.** Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) durante o armazenamento por 1, 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii, iv e v, respectivamente) antes e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástrica após 2 horas e entérica após 4 horas e 6 horas de ensaio82
- Figura 7.** Sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) frente às condições gástricas e entéricas simulada *in vitro*, durante o armazenamento por 1 (i) , 14 (ii) e 28 (iii) dias, através dos métodos convencional, qPCR sem PMA e qPCR com PMA89
- Figura 8.** Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) frente às condições gástricas e entéricas simulada *in vitro*, durante o armazenamento por 1 (i) , 14 (ii) e 28 (iii) dias, através dos métodos convencional, qPCR sem PMA e qPCR com PMA90

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
rDNA	<i>Ribosomal Desoxyribonucleic Acid</i>
DP	<i>Degree of Polymerization</i>
DVS	<i>Direct Vat Set</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>
FOS	Fruto-oligossacarídeo
MRS	<i>Agar DeMan-Rogosa-Sharpe</i>
PMA	<i>Propidium Monoazide</i>
PP	Pontos Percentuais
QC	Queijo <i>petit-suisse</i> controle
QP	Queijo <i>petit-suisse</i> probiótico
qPCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
QS	Queijo <i>petit-suisse</i> simbiótico
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
TE	<i>Tris-Ethylenediamine Tetra Acetic Acid</i>
TGI	Trato Gastrintestinal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VET	Valor Energético Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Alimentos funcionais	25
1.2 Os micro-organismos e os alimentos probióticos.....	26
1.3 Os ingredientes e os alimentos prebióticos.....	28
1.4 Os alimentos simbióticos	30
1.5 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	31
1.6 Aplicação de probióticos e prebióticos em matrizes alimentares	33
1.7 Os queijos e o queijo <i>petit-suisse</i> como veículo probiótico e simbiótico	34
1.8 Emprego de técnicas de biologia molecular para o estudo da microbiota em ambientes complexos	36
1.9 Justificativa para o presente trabalho.....	38
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Fabricação dos queijos <i>petit-suisse</i> potencialmente probiótico, simbiótico e controle	39
3.2 Períodos de armazenamento e amostragem dos queijos <i>petit-suisse</i>	45
3.3 Determinações de pH	45
3.4 Determinação da composição centesimal e cálculo do valor energético total (VET) dos queijos.....	45
3.5 Determinação do perfil de textura instrumental.....	46
3.6 Análises microbiológicas dos queijos.....	46
3.6.1 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura <i>starter</i> , utilizando métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo	46
3.6.2 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura <i>starter</i> nos queijos, utilizando método independente de cultivo (qPCR)	47

3.7 Monitoramento dos micro-organismos indicadores de contaminação e pesquisa de patógenos.....	50
3.8 Sobrevivência dos probióticos incorporados nos queijos frente às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i>	51
3.8.1 Monitoramento dos micro-organismos probióticos, utilizando métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo	53
3.8.2 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura <i>starter</i> nos queijos, utilizando métodos independentes de cultivo.....	53
3.8.3 Cálculo da Taxa de Sobrevivência	55
3.9 Análise sensorial	55
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5.1 Valores de pH.....	57
5.2 Composição centesimal e valor energético total (VET) dos queijos	59
5.3 Perfil de textura instrumental dos queijos	61
5.4 Análise sensorial	66
5.5 Viabilidade dos micro-organismos probióticos durante o período de armazenamento.....	69
5.6 Monitoramento dos micro-organismos indicadores de contaminação e pesquisa de patógenos.....	77
5.7 Sobrevivência dos probióticos incorporados nos queijos frente às condições gástricas e entéricas simuladas <i>in vitro</i>	79
6. PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS	94
7. CONCLUSÕES.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXO A - Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	113
ANEXO B - Modelo de Ficha para Teste de Aceitabilidade	115
ANEXO C - Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	116

ANEXO D – Imagem representativa da regressão linear obtida a partir das curvas padrão em reação de PCR em tempo real (qPCR), para <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 (D.1), <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 (D.2) e <i>Streptococcus thermophilus</i> (D.3).....	118
ANEXO E - Imagem representativa da curva de dissociação obtida a partir de reação de PCR em tempo real (qPCR), para <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 (E.1), e <i>Streptococcus thermophilus</i> (E.2).	120

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

No contexto atual, a nutrição humana tem recebido atenção especial. Fatores culturais, econômicos, sociais e de saúde interferem, de forma significativa, na escolha dos alimentos e na composição da dieta. Os consumidores tem procurado atender, não apenas suas necessidades biológicas básicas, como também buscam saúde e bem-estar (MCGILL, 2009).

Neste panorama emerge o interesse em um “alimento funcional”, cuja proposta não se limita a um recurso para obtenção de energia e nutrientes, mas como um potencial contribuinte na manutenção da saúde e bem-estar e na redução de riscos de doenças (SAAD, 2006).

O termo “alimento funcional” foi primeiramente descrito no Japão em meados dos anos 80 em um contexto de promoção da saúde, com objetivo de reduzir gastos com a saúde pública. Foi definido como “produto alimentício fortalecido com constituintes especiais que possuem efeitos fisiológicos vantajosos”. Propôs-se uma propriedade ao alimento que o diferencia de propriedades tradicionais, relativas aos componentes nutricionais ou sensoriais (ARAI, 1996; CARDARELLI et al., 2008).

Atualmente, se aceita que alimentos funcionais são alimentos que proporcionam benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suprir as funções nutricionais básicas. Devem caracterizar-se como um alimento ou um ingrediente convencional da dieta e demonstrar seus efeitos em quantidades usualmente consumidas (CLYDESDALE, 1997; EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE, 1999; ARVANITOYANNIS & VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005; KHAN et al., 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não define alimento funcional e sim “alegação de propriedade funcional” e/ou “alegação de propriedade de saúde” (ANVISA, 1999a, b).

As diretrizes para esse tipo de alimento permitem alegações relacionadas ao papel fisiológico no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo e, ainda, alegações sobre a manutenção geral da saúde e a redução de risco de doenças, em caráter opcional. Não são permitidas alegações que façam referência à

cura ou à prevenção de doenças. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais e/ou de saúde pode, além de funções básicas, produzir efeitos benéficos à saúde (STRINGHETA et al., 2007).

A incorporação da dieta a um estilo de vida saudável, uma vez que esta pode estar associada à promoção da saúde, levou à criação de um mercado para produtos funcionais. A estratégia da indústria alimentícia consiste em modificar seus produtos, a fim de torná-los mais saudáveis e os inserir na categoria de alimento funcional. Esse novo produto, no entanto, deve ser de aparência semelhante ao alimento convencional e consumido como parte de uma dieta usual (WALJI & BOON, 2008).

Nos últimos 10 anos, o setor de alimentos funcionais apresentou um dos mais rápidos crescimentos entre os setores de alimentos, com uma taxa de crescimento de 8,6% ao ano, até 2012. Atualmente, criou-se um novo segmento de mercado, denominado “Saúde e Bem-estar”, o qual movimentou, no mundo, cerca de 625 bilhões de dólares no ano de 2012, sendo que 168 bilhões de dólares correspondiam ao setor de alimentos funcionais (KHAN et al., 2012).

No Brasil, os ingredientes que apresentam alegação de funcionalidade são: ômega 3, licopeno, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, beta-glucana, dextrina resistente, fruto-oligossacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, *psillium* ou *psyllium*, quitosana, fitoesteróis, os polióis: manitol, xilitol e sorbitol, probióticos (somente algumas espécies) e proteína de soja (ANVISA, 2008).

Desvendar os mitos e folclores que envolvem ingredientes e alimentos funcionais constitui um desafio. A literatura ainda apresenta conclusões limitadas e necessita de mais estudos, ensaios clínicos controlados, randomizados com humanos para melhor conhecimento de evidências e comprovação da propriedade dos alimentos funcionais (DUGGAN, GANNON & WALKER, 2002).

1.2 OS MICRO-ORGANISMOS E OS ALIMENTOS PROBIÓTICOS

Dentre os alimentos com alegação de propriedade funcional, destacam-se os probióticos, definidos pela Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization* - FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) como micro-organismos vivos que,

quando administrados em quantidades adequadas, conferem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

O termo probiótico significa “para a vida” e está relacionado a micro-organismos que apresentam efeitos benéficos à saúde humana. A primeira referência foi de Eli Metchnikoff em 1907, o qual alertou para a importância dos probióticos na longevidade e saúde humana. Adicionalmente, sugeriu que micro-organismos intestinais estão intimamente relacionados à alimentação, sendo que esta interação permite intervenções, a fim de modificar uma microbiota intestinal composta por micro-organismos patogênicos para uma microbiota com micro-organismos benéficos (METCHNIKOFF, 1907).

Alguns critérios são desejados para um micro-organismo probiótico, tais como: segurança (origem, patogenicidade, fatores de virulência); critérios tecnológicos (estabilidade genética da cepa, viabilidade adequada durante processamento e armazenamento, boa aceitabilidade sensorial, resistência a fagos, produção em grande escala); critérios funcionais (tolerância ao suco gástrico e bile, capacidade de adesão à superfície da mucosa, efeitos benéficos à saúde validados e bem documentados); critérios fisiológicos desejáveis (imunomodulação, atividade contra patógenos, controle do colesterol e da intolerância à lactose, propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas) (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Probióticos são representados, em sua maioria, pelos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, naturalmente encontrados em humanos, no íleo terminal e cólon, respectivamente. Seus benefícios têm sido amplamente contemplados na prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais, como diarreia, constipação intestinal, gastroenterites, infecções respiratórias, modulação do sistema imune de forma sistêmica ou com melhora da barreira intestinal contra patógenos, controle do perfil lipídico e da hipertensão (HOLZAPFEL et al., 1998; KOMATSU, BURITI & SAAD, 2008; WOHLGEMUTH, LOH & BLAUT, 2010; MERENSTEIN et al., 2010; SAAD, BEDANI & MAMIZUKA, 2011).

De acordo com a legislação brasileira, os micro-organismos probióticos devem alcançar uma quantidade mínima viável situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Ainda segundo essa legislação, valores menores podem ser aceitos, necessitando da comprovação de sua eficácia (ANVISA, 2008).

Matrizes alimentícias, particularmente lácteas, têm sido estudadas como veículos promissores para micro-organismos probióticos. Laticínios, como o leite, iogurte, leite fermentado, sobremesas e queijos representam matrizes potenciais para probióticos. Estudos têm testado espécies de lactobacilos e bifidobactérias nestas matrizes e encontram viabilidade na utilização destes alimentos como veículo probiótico, não somente em relação à estabilidade dos micro-organismos como também em relação às propriedades tecnológicas e sensoriais (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000; BURITI et al., 2007a; ALLGEYER, MILLER & LEE, 2010; PEREIRA et al., 2010; FORTIN et al., 2011).

Iogurtes e leites fermentados são os mais conhecidos e bem estabelecidos veículos probióticos, pois além de suas características físico-químicas e funcionais, os efeitos benéficos relacionados às bactérias lácticas no leite fermentado são associados à saúde pelos consumidores (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Diversas bactérias lácticas têm sido utilizadas na produção de iogurtes, inclusive cepas probióticas. A suplementação do leite com ingredientes funcionais é uma proposta para desenvolvimento de novos produtos (ALLGEYER, MILLER & LEE, 2010; ESPÍRITO SANTO et al., 2010).

1.3 OS INGREDIENTES E OS ALIMENTOS PREBIÓTICOS

O conceito de prebióticos é recente e foi introduzido em 1995 por Gibson e Roberfroid como uma abordagem alternativa capaz de superar as questões de sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento e distribuição do produto, além das condições do trato gastrointestinal (TGI). Os prebióticos foram definidos como ingredientes não digeríveis da dieta, que proporcionam efeitos benéficos à saúde por estimularem seletivamente a multiplicação e/ou atividade de bactérias no cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

Desde então, várias definições foram estabelecidas e mais recentemente, GIBSON et al. (2010) sugeriram um conceito o qual remete à definição de 1995, em que os prebióticos consistem em ingredientes seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal a qual conferem benefícios à saúde.

A propriedade de ser indigerível pelo TGI não foi incluída nas últimas definições de prebióticos. No entanto, sabe-se que para conferir os efeitos

propostos, o ingrediente não pode ser digerido ou então deve ser apenas parcialmente digerido antes de alcançar o TGI inferior (KOLIDA & GIBSON, 2011).

Por favorecerem a multiplicação de bactérias benéficas à saúde, proporcionam benefícios à saúde humana semelhante àqueles atribuídos aos probióticos. Entre eles, incluem-se a proteção intestinal contra micro-organismos patogênicos, a produção de substrato energético para as células do epitélio intestinal, a modulação do sistema imune e da expressão gênica e a diferenciação de células do epitélio intestinal. Além disso, suas propriedades favorecem a absorção de cálcio, proporcionam aumento do peso fecal, reduzem tempo de trânsito gastrointestinal e regulam os níveis de lipídios séricos (SAAD, 2006; *WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION*, 2008; ROBERFROID, 2008a; LAVANDA et al., 2011).

Geralmente, para ser considerado prebiótico, o composto em questão deve apresentar os requisitos: ser resistente ao ácido gástrico, não ser hidrolisado por enzimas humanas, não ser absorvido pelo TGI, ser fermentado pela microbiota intestinal e favorecer seletivamente a multiplicação e/ou atividade de bactérias potencialmente benéficas à saúde (ROBERFROID, 2008b).

Atualmente, no Brasil, a ANVISA (2008) reconhece os ingredientes inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) com propriedades prebióticas. A União Europeia inclui no conceito de prebiótico, além de inulina e FOS, os galacto-oligossacarídeos (GOS) e a lactulose (KOLIDA & GIBSON, 2011).

Alguns ingredientes têm sido estudados extensivamente em testes *in vitro* e *in vivo* (estudos em humanos), a fim de averiguar potenciais efeitos prebióticos. No entanto, a maior dificuldade consiste em assegurar que esses compostos sejam fermentados apenas por bactérias benéficas à saúde e ainda que os produtos dessa fermentação não favoreçam a multiplicação e/ou atividade de potenciais patógenos (KOLIDA & GIBSON, 2011).

De acordo com ROBERFROID (2007), inulina e FOS, estão entre os maiores grupos de oligossacarídeos considerados bifidogênicos, por proporcionarem a multiplicação de bifidobactérias. A inulina ocorre naturalmente em vegetais como chicória, cebola, alho, alcachofra de Jerusalém, tomate e banana e a oligofrutose ocorre em alimentos como trigo, mel, alho-poró, banana e cebola. Comercialmente,

inulina e oligofrutose são principalmente obtidas a partir de chicória e açúcar de beterraba (ROBERFROID, 2007).

Tanto inulina quanto FOS são resistentes à hidrólise por enzimas digestivas, devido à sua configuração β no resíduo d-frutose da ligação glicosídica entre as moléculas. Enzimas digestivas humanas são mais específicas para ligações α -glicosídicas (ROBERFROID, 1999). Como não são digeríveis, os prebióticos na luz intestinal exercem efeito osmótico enquanto não são fermentados. A partir do momento que se inicia a fermentação pela microbiota endógena, principalmente no intestino, ocorre aumento da produção de gás. Em alguns casos, podem ser pouco tolerados em indivíduos com síndrome do intestino irritável ou ocasionarem diarreia pelo seu efeito osmótico. Entretanto, geralmente são bem tolerados em doses baixas. (SAAD, 2006)

1.4 OS ALIMENTOS SIMBIÓTICOS

Os alimentos simbióticos contêm combinações apropriadas de ingredientes prebióticos e micro-organismos probióticos. Um produto simbiótico exerce um efeito tanto probiótico como prebiótico.

Em teoria, o probiótico alcança seu local de ação, no caso, a luz intestinal, nutrindo-se de substratos prebióticos. Além disso, a interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico, anterior ao consumo e, em alguns casos, isto pode resultar em vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Um efeito desejável de um simbiótico é favorecer a sobrevivência do probiótico, durante a sua passagem pelo TGI. O termo simbiótico refere-se indiretamente a uma sinergia e, por isso, alguns autores tem sugerido que este termo deve referir-se exclusivamente aos produtos em que o composto prebiótico favorece seletivamente determinado probiótico (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001; KOLIDA & GIBSON, 2011).

Na definição proposta recentemente existem duas abordagens para os simbióticos. A primeira delas seria a complementaridade, em que o probiótico é escolhido por um efeito benéfico à saúde específico e o prebiótico é independentemente escolhido para aumentar a concentração de micro-organismos

benéficos da microbiota. A segunda propõe a sinergia, na qual, novamente, o probiótico é escolhido por um efeito benéfico à saúde específico, mas neste caso, o prebiótico é selecionado especificamente para estimular a multiplicação e a atividade do probiótico em questão (KOLIDA & GIBSON, 2011).

A fim de estudar a interação entre probiótico e prebiótico, BIELECKA, BIEDRZYCKA e MAJKOWSKA (2002) avaliaram o efeito *in vitro* de diferentes oligossacarídeos na população de cepas do gênero *Bifidobacterium*. Os resultados sugeriram que oligossacarídeos de menor grau de polimerização, tais como FOS e oligofructose apresentaram melhores resultados no crescimento de bifidobactérias, quando comparados ao controle (lactose) ou inulina de elevado grau de polimerização ($DP \geq 22$).

CARDARELLI et al. (2007) avaliou diferentes formulações de queijo *petit-suisse* e observou que formulações com adição dos prebióticos inulina e oligofructose proporcionaram maior multiplicação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, resultando em um produto mais interessante, em termos de potencial funcional.

1.5 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus*

Bifidobacterium spp. são bactérias Gram-positivas, anaeróbias estritas e apresentam vários aspectos, com formas bifurcadas em Y ou V. São produtoras de ácido láctico e acético, multiplicam-se em temperaturas de 20 a 46 °C, sendo que a 60 °C não sobrevivem (HARMSSEN et al., 2000). O interesse pelos micro-organismos do gênero *Bifidobacterium* tem aumentado, diante de seu potencial como probiótico, levando à busca pela compreensão de sua fisiologia, metabolismo e genética (MOHAN et al., 2008; WOHLGEMUTH, LOH & BLAUT, 2010).

Uma ampla atividade probiótica tem sido atribuída às bifidobactérias, incluindo efeitos como a modulação do sistema imune, com atividade anti-inflamatória associada (OUWEHAND, LEYER & CARCANO, 2008) e a prevenção de infecções respiratórias em recém-nascidos (TAIPALE et al., 2011).

O desafio em relação a *Bifidobacterium* spp. e sua aplicabilidade em alimentos, particularmente em produtos lácteos fermentados (iogurtes), consiste na sua sensibilidade ao pH ácido desse produto (pH entre 3,7 e 4,3). A multiplicação das bifidobactérias apresenta pH ótimo entre 6,5 e 7,0 e em pH inferior a 5 já ocorre queda na viabilidade da cepa no produto (VINDEROLA et al., 2002). Outro desafio

consiste na superação das barreiras biológicas, a princípio a acidez gástrica e, em seguida, à bile no intestino. Os sais biliares atuam como detergentes e desestruturam a camada lipídica da membrana celular e induzem dano oxidativo ao DNA (SANCHÉZ, REYES-GAVILÁN & MARGOLLES, 2006).

Lactobacillus spp. pertencem a um grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, apresentam-se na forma de bastonetes não flagelados. São bactérias anaeróbias facultativas e habitam a microbiota natural humana. Produzem, principalmente, ácido láctico e ácido acético, com redução do pH, proporcionando um ambiente desfavorável a micro-organismos patogênicos (GOMES & MALCATA, 1999).

Lactobacillus spp. podem ser encontrados tanto no TGI, mais especificamente no intestino delgado, bem como no trato geniturinário (RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICZ, 2009). Constituem uma proporção importante da microbiota humana e animal e sua permanência e sobrevivência está relacionada a fatores ambientais, que incluem pH, disponibilidade de oxigênio, presença de secreções e interações bacterianas (O'SULLIVAN, 2006; RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICZ, 2009).

Sua aplicabilidade clínica está principalmente relacionada à promoção da saúde dos tratos gastrintestinal e geniturinário. YOUNG e HUFFMAN (2003) verificaram que *L. acidophilus*, juntamente com *Bifidobacterium infantis*, reduziram a incidência de enterocolite necrozante em recém-nascidos. A melhoria dos sintomas de intolerância à lactose e o controle de diarreia aguda ou por antibioticoterapia também foram associados à ingestão de *L. acidophilus* (KAILASAPATHY & CHIN, 2000; RERKSUPPAPHOL & RERKSUPPAPHOL, 2010; MCFARLAND, 2010).

Para a sua multiplicação, *Lactobacillus* spp. requerem ambiente microaerofílico ou anaeróbio e a presença carboidratos fermentáveis, proteínas, vitaminas do complexo B, ácidos graxos livres e minerais, como o manganês, magnésio e ferro. Uma matriz láctea favorece essa multiplicação, devido à disponibilidade desses nutrientes (GOMES & MALCATA, 1999). Segundo TAILLANDIER et al. (1996), esses micro-organismos apresentam um pH ótimo de crescimento de 6,0 e temperatura de 30 °C. Em condições de pH inferiores a 4, cessa-se a multiplicação de *Lactobacillus*.

Tanto *Bifidobacterium* quanto *Lactobacillus* são gêneros contemplados no ramo da tecnologia de alimentos. Vários estudos concluem sobre a boa viabilidade

de bactérias desse gênero em diversas matrizes alimentares, destacando-se os queijos, como o minas frescal (BURITI et al., 2005; BURITI, ROCHA & SAAD, 2005; BURITI et al., 2007a).

As cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Lactobacillus acidophilus* LA-5 em co-cultura tem sido amplamente estudadas e efeitos benéficos à saúde tem sido a elas associados. Benefícios incluem a melhora dos sintomas de doença inflamatória intestinal crônica (WILDT et al., 2006), redução de micro-organismos associados a cáries em saliva de adolescentes entre 12 e 14 anos (SINGH, DAMLE & CHAWLA, 2011), redução da glicemia de jejum em adultos com Diabetes tipo 2 (EJTAHED et al., 2012) ou, ainda, redução do risco de dermatite atópica em lactentes, quando o alimento probiótico foi incorporado na dieta da mãe (DOTTERUD, STORRØ & ØIEN, 2010), embora o último estudo tenha incluído a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG, além de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5.

As cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Lactobacillus acidophilus* LA-5, de propriedade da Christian Hansen, Dinamarca, são utilizadas rotineiramente em diversos produtos probióticos comercializados mundialmente e inclusive no Brasil.

1.6 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS EM MATRIZES ALIMENTARES

A viabilidade e atividade de micro-organismos são peculiares para cada cepa e dependem da matriz à qual serão incorporadas. É fundamental conhecer a dinâmica e vida útil das cepas no produto, durante a sua elaboração e seu armazenamento, bem como conhecer a resistência e sobrevivência dos micro-organismos probióticos em sua matriz alimentícia quando submetidos às condições encontradas no TGI (KAILASAPATHY & CHIN, 2000).

O conteúdo lipídico, a concentração e tipo de proteínas, açúcar e pH dos produtos são alguns dos fatores que podem afetar a multiplicação e a sobrevivência dos micro-organismos probióticos nos alimentos. Dentre outros fatores, destacam-se: a cepa empregada, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação, a acidez final do produto, a concentração de ácido láctico e acético, a pós-acidificação, a composição da co-cultura, a presença de fatores de crescimento

no leite, a presença de ingredientes prebióticos e as condições de estocagem (SHAH, 2000; VINDEROLA & REINHEIMER, 2000; RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010; ALLGEYER, MILLER & LEE, 2010; FORTIN et al., 2011; SAAD et al., 2011).

Além da viabilidade dos probióticos no produto durante seu armazenamento, é fundamental a sobrevivência às condições do TGI. Os alimentos atuam como protetores durante a passagem pelo TGI, particularmente na barreira gástrica. Além disso, a presença de ingredientes funcionais pode influenciar na sobrevivência do probiótico durante o trânsito pelo trato gastrointestinal (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

Aspectos relacionados à aceitabilidade do produto devem ser considerados, já que as substâncias produzidas pelos micro-organismos envolvidos, principalmente compostos ácidos, podem influenciar a textura e alterar a palatabilidade do produto final, de forma a favorecer ou não esse produto (CARDARELLI et al., 2007).

Uma vantagem dos prebióticos sobre os probióticos é que independem de viabilidade da cultura. Além disso, constituem ingredientes da dieta humana e não representam um grande desafio nos aspectos de segurança e de aceitabilidade pelo consumidor como exigem os probióticos (WELLS, SAULNIER & GIBSON, 2008). Podem ser adicionados a diversos alimentos, incluindo iogurtes, cereais, pães, biscoitos, sobremesas lácteas, sorvetes e até como uma forma de tornar um alimento mais saudável, quando utilizado para substituir a gordura do produto ou para melhorar o sabor e a textura do produto (CARDARELLI et al., 2008; FRANCK, 2008; BURITI, CASTRO & SAAD, 2010).

1.7 OS QUEIJOS E O QUEIJO *PETIT-SUISSE* COMO VEÍCULO PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO

Diversos estudos observaram uma boa adaptação de probióticos em queijos, com viabilidade adequada, além de uma influência positiva na textura e em propriedades sensoriais quando os micro-organismos probióticos eram adicionados aos produtos (CRUZ et al., 2011; BURITI, SOUZA & SAAD, 2012).

A utilização de queijos como veículos de probióticos é vantajosa, sendo uma alternativa valiosa para a indústria de laticínios. Apresentam um pH mais elevado em relação aos iogurtes e leite fermentados, além de maior teor de lipídios, elevada

disponibilidade de nutrientes, baixo teor de oxigênio e matriz de textura densa, fatores estes que conferem maior estabilidade para a sobrevivência das culturas probióticas (RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICZ, 2009; KARIMI, MORTAZAVIAN & CRUZ, 2011; BURITI, SOUZA & SAAD, 2012).

Entretanto, o desenvolvimento de queijos probióticos em escala industrial requer um conhecimento de todas as etapas envolvidas no processamento tradicional e, geralmente, uma adaptação dos protocolos existentes faz-se necessária (CRUZ et al., 2009).

Vários estudos testaram diferentes tipos de queijos como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*: cheddar ou semelhante ao cheddar (STANTON et al., 1998), cottage (BLANCHETTE et al., 1996), queijo elaborado com leite caprino (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2012), queijos frescos (VINDEROLA et al., 2000), incluindo o Minas Frescal (BURITI, ROCHA & SAAD, 2005; BURITI et al., 2005; BURITI et al., 2007a; SOUZA et al., 2008; SOUZA & SAAD, 2009) e o queijo fresco cremoso (BURITI, CARDARELLI & SAAD, 2007; BURITI et al., 2007b), entre outros (ROSS et al., 2000; BOYLSTON et al., 2004; BERGAMINI et al., 2005).

Desenvolvido em meados do século XIX, o queijo *petit-suisse* é um queijo elaborado com leite desnatado adicionado de creme de leite. Trata-se de um queijo de altíssima umidade, de consistência leve, lisa, cremosa e pode assumir sabor doce ou salgado, dependendo dos ingredientes adicionados (SANDRAZ, 1989).

O queijo do tipo *petit-suisse* é direcionado à população infantil e comumente comercializado e utilizado no Brasil, embora sem a suplementação com bactérias probióticas e prebióticos. No Brasil, esse queijo é fabricado industrialmente por centrifugação da coalhada, para a separação do soro, obtendo-se o queijo "quark", que é utilizado como base para o queijo *petit-suisse*. Ao queijo "quark" adiciona-se polpa de fruta, açúcar e creme (VEIGA et al., 2000).

Com o objetivo de transformar o queijo *petit-suisse* em um alimento funcional probiótico e simbiótico (com os micro-organismos potencialmente probióticos *Lactobacillus acidophilus* Lac-4 e/ou *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL-04 e prebióticos), MARUYAMA et al. (2006) e CARDARELLI et al. (2008) desenvolveram estudos nesse sentido, com excelentes resultados, inclusive sob o ponto de vista de aceitabilidade sensorial.

Os bons resultados foram confirmados posteriormente, com a utilização de outras cepas probióticas individuais - *L. acidophilus* LA-5 e/ou *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04 (PEREIRA et al., 2010). Os estudos de MARUYAMA et al. (2006) e CARDARELLI et al. (2008) resultaram no depósito de uma patente (SAAD, CARDARELLI & MARUYAMA, 2007).

Adicionalmente, foi realizado estudo em modelos de fermentação *in vitro* sobre o potencial funcional do queijo *petit-suisse* elaborado com *B. lactis* BL-04 e *L. acidophilus* LA-5 adicionado ou não de prebióticos e evidenciou-se a importância dos ingredientes prebióticos na elaboração do produto para o seu potencial funcional (CARDARELLI et al., 2007).

1.8 EMPREGO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA EM AMBIENTES COMPLEXOS

Análises microbiológicas com quantificação e identificação dos micro-organismos são parâmetros fundamentais na produção de alimentos. São aplicadas tanto no controle de qualidade do produto e na preservação do alimento, como para verificar a eficiência da cultura fermentativa e acompanhar cepas específicas (GIRAFFA & CARMINATI, 2008).

No entanto, a avaliação da diversidade microbiológica em alimentos fermentados é dificultada diante da necessidade de se estabelecer condições necessárias para a multiplicação bacteriana, requerimento de condições estritamente anaeróbicas para algumas espécies, além de dificuldades relacionadas à simulação de interações entre as bactérias e outros micro-organismos. Tais limitações motivam o emprego de métodos independentes de cultivo para o estudo da atividade e estrutura microbiana em ambientes complexos (ZOETENDAL et al., 2004; GIRAFFA & CARMINATI, 2008).

O estudo de micro-organismos presentes tanto em alimentos quanto no TGI humano está relacionado à investigação da sua quantidade e diversidade, suas atividades e sua interação (competição/sinergia) com os micro-organismos já presentes no hospedeiro (ZOETENDAL et al., 2004).

A maioria dos métodos para monitoramento e identificação de bactérias gastrintestinais em ambiente complexo se baseiam na análise da sequência da subunidade 16S do *operon* do RNA ribossômico (16S rRNA) (VAUGHAN et al.,

2005). Durante a última década, esse método tem revolucionado a maneira como taxonomistas identificam e classificam as bactérias, já que este compreende regiões altamente conservadas do gene, bem como outras regiões suficientemente variáveis, para a diferenciação entre espécies. Bancos de dados dispõem mais de milhões de sequências de genes, atualizados mensalmente para utilização do 16S rRNA (VAUGHAN et al., 2005; JUSTÉ, THOMMA & LIEVENS, 2008).

Baseadas em sequências específicas de 16S rRNA incluem-se técnicas de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE - *denaturing gradient gel electrophoresis*) e de eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE - *temperature-gradient gel electrophoresis*), as quais permitem monitorar mudanças no ambiente microbiano, no tempo e comparar o ambiente microbiano em diferentes alimentos (GIRAFFA & CARMINATI, 2008).

Outro método tem sido desenvolvido para detecção e quantificação de bactérias: o método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real. Trata-se de uma ferramenta promissora em estudos que visam quantificar populações de micro-organismos associadas a alimentos e apresenta a vantagem de quantificar micro-organismos, mesmo quando em pequenas proporções na amostra. Tem sido amplamente aplicado para a enumeração de bactérias e fungos em alimentos fermentados, como leite fermentado e vinhos (GIRAFFA & CARMINATI, 2008).

No entanto, uma limitação de técnicas moleculares, como o qPCR, consiste em não distinguir células vivas e mortas na detecção dos micro-organismos. Com o intuito de superar esta limitação, tem-se proposto a utilização de PMA (*Propidium Monoazide*) e EMA (*Ethidium Monoazide*) (NOCKER, CHEUNG & CAMPER, 2006; GARCÍA-CAYUELA et al., 2009).

O PMA e o EMA são agentes intercalantes ao DNA, impermeáveis à membrana celular. O propósito de sua utilização é de que ocorra a ligação com o DNA dos micro-organismos probióticos, cuja membrana celular esteja rompida ou danificada (células mortas), omitindo a sua detecção quando da utilização da técnica de qPCR. Assim, somente as células viáveis seriam detectadas e quantificadas no método de qPCR (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009).

Métodos convencionais estão cada vez mais sendo utilizados como meio para representar a ampla diversidade microbiana existente na natureza. Os métodos independentes de cultivo tem se tornado técnicas mais apropriadas, considerando sua capacidade de melhor caracterizar e especificar o micro-organismo e não apresentar as limitações dos métodos convencionais (ZOETENDAL, VAUGHAN & DE VOS, 2006). No caso específico dos produtos lácteos, a utilização de ferramentas de biologia molecular tem aprimorado o conhecimento sobre a sequência de cepas e espécies microbianas durante a elaboração e a maturação de queijos. As técnicas independentes de cultivo possibilitam uma investigação rápida sobre a diversidade e a dinâmica de micro-organismos nesses produtos (GIRAFFA & CARMINATI, 2008; COPPOLA, BLAIOTTA & ERCOLINI, 2008).

1.9 JUSTIFICATIVA PARA O PRESENTE TRABALHO

Diante do atual contexto em que se almeja a manutenção do bem-estar e saúde e a redução de riscos de doenças crônicas, a possibilidade de se obter um produto alimentício probiótico e/ou simbiótico, de forma a propiciar os benefícios à saúde conferidos a estes ingredientes é bastante promissora.

Além disso, busca-se não só obter um produto viável sob o aspecto funcional, mas também seguro, com propriedades nutricionais, físico-químicas e sensoriais adequadas para consumidor. Ensaios de sobrevivência *in vitro* na presença de enzimas digestivas, que simulam as condições da passagem dos micro-organismos probióticos incorporados em determinados alimentos pelo TGI vem sendo aplicados pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010; BEDANI, ROSSI & SAAD, 2013).

Os ensaios realizados com alguns produtos desenvolvidos revelaram que o comportamento das cepas probióticas, tanto no produto ao longo de seu armazenamento como nesses ensaios *in vitro* depende da cepa em si, do produto ao qual uma cepa em particular é incorporada e, ainda, de determinados ingredientes presentes na formulação do produto e da temperatura em que ele é armazenado.

A avaliação da sobrevivência dos probióticos no alimento ou em ensaios de sobrevivência *in vitro* utilizando-se métodos convencionais dependentes de cultivo tem sido questionada diante de suas limitações. Em contrapartida, o emprego de técnicas independentes de cultivo tem recebido atenção especial, considerando sua

capacidade de melhor caracterizar e especificar o micro-organismo e não apresentar as limitações dos métodos convencionais.

Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar a sobrevivência de cepas probióticas incorporadas em queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e simbiótico no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no TGI, utilizando técnicas independentes de cultivo, paralelamente aos métodos convencionais. Adicionalmente, foram verificadas as características tecnológicas dos queijos, o que incluiu, entre outros, a determinação da textura instrumental dos produtos e a sua avaliação sensorial.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a sobrevivência de cepas probióticas da cultura ABT (contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* como cultura *starter*), incorporadas em queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e simbiótico no produto armazenado por até 28 dias e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no TGI, utilizando técnicas independentes de cultivo, paralelamente aos métodos convencionais;
- Avaliar a influência de uma mistura prebiótica (inulina + fruto-oligossacarídeo) sobre a sobrevivência de cepas probióticas incorporadas em queijo *petit-suisse* no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no TGI;
- Verificar a aceitabilidade sensorial e outras características tecnológicas relacionadas dos queijos *petit-suisse* probiótico e simbiótico frente a um produto elaborado sem a adição dos ingredientes funcionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fabricação dos queijos *petit-suisse* potencialmente probiótico, simbiótico e controle

Para a elaboração do queijo *petit-suisse* foi utilizada a formulação desenvolvida experimentalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da USP/SP por CARDARELLI et al. (2008), porém com modificações nas proporções entre os ingredientes. As formulações foram elaboradas com a combinação de gomas proposta por MARUYAMA et al. (2006) e PEREIRA et al. (2010).

Foram estudadas 3 formulações de queijo *petit-suisse*, como apresentado na Tabela 1. A formulação QP (queijo probiótico), foi elaborada com a cultura probiótica ABT-4, composta dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e da cultura *starter* *Streptococcus thermophilus* (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca), liofilizada do tipo DVS (*Direct Vat Set* - para a adição direta ao leite, durante a elaboração dos produtos); QS (queijo simbiótico), foi elaborada com probióticos e prebióticos, com a adição da cultura ABT-4 e com os prebióticos: inulina e FOS, na proporção de 7,5 e 2,5% (m/m), respectivamente; QC (queijo controle), apresenta adição somente da cultura *starter* *S. thermophilus* (sem a adição de probióticos e prebióticos), utilizada como formulação controle para os parâmetros físico-químicos, testes de aceitabilidade (análise sensorial) e monitoramento da população de *S. thermophilus*.

Tabela 1. Variáveis empregadas na elaboração dos queijos *petit-suisse* estudados.

Queijos	Probióticos ¹	Prebióticos ²
QP	+	-
QS	+	+
QC ³	-	-

¹ Cultura probiótica ABT, composta dos micro-organismos comprovadamente probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e da cultura *starter* *Streptococcus thermophilus* (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

² Ingrediente prebiótico: 7,5% (m/m) de inulina (Beneo™ GR, Orafiti, Oreya, Bélgica) + 2,5% (m/m) de oligofrutose (Beneo™ P95, Orafiti).

³ Produto controle, elaborado apenas com a adição de uma cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* ST-M6 (Christian Hansen).

A elaboração do queijo *petit-suisse* consistiu na obtenção de uma massa-base de queijo *quark*, representada na Figura 1. À massa-base de queijo *quark* foi adicionada uma mistura para a obtenção do queijo *petit-suisse*, contendo ou não a mistura prebiótica, de acordo com a formulação. Os ingredientes empregados na mistura para a elaboração dos queijos *petit-suisse* encontram-se na Tabela 2. O

fluxograma de elaboração do queijo *petit-suisse* a partir da massa-base de queijo *quark* está representado na Figura 2.

Cada formulação de queijo *petit-suisse* foi realizada com 3 repetições (lotes) de produção. Cada repetição foi elaborada a partir de 10 a 40 L de leite, obtendo-se, respectivamente, 1 a 4 kg de massa-base de queijo *quark*, conforme a necessidade da análise a ser realizada.

Os queijos foram embalados em potes plásticos individuais de polipropileno, próprios para alimentos (68 mm de diâmetro, 32 mm de altura, 55 ml de volume total, Tries Aditivos Plásticos, São Paulo, Brasil), contendo 35 g cada, selados com tampa de alumínio em seladora Delgo (n^o 1968, Delgo Metalúrgica, Cotia, Brasil) e armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C), por até 28 dias.

Tabela 2. Ingredientes utilizados na elaboração de queijo *petit-suisse* e respectivas proporções (queijo *petit-suisse* QP = probiótico; QS = simbiótico; QC = controle).

Ingredientes	Proporção adicionada (g/100 g)	
	Queijos QP e QC	Queijos QS
Massa-base de queijo quark	61,97	57,50
Creme de leite (25% de gordura) ¹	13,72	12,00
Polpa de morango congelada ²	11,51	10,00
Açúcar ³	11,00	9,00
Goma Guar ⁴	0,30	0,20
Goma Xantana ⁵	0,19	0,15
Goma Carragena ⁶	0,19	0,15
Corante/Aroma ⁷	1,12	1,00
Inulina ⁸	0,00	7,50
FOS ⁹	0,00	2,50
Total	100,00	100,00

¹ Nestlé (Araçatuba, Brasil); ² Ice-Fruit-Maisa (Mossoró, Brasil); ³ Coopersucar-União (Limeira, Brasil); ^{4,5,6} Grindsted 178-B, 80 e CY-500 (Danisco, Cotia, Brasil); ⁷ Preparado de morango 71341 (Germinal, Cabreúva, Brasil); ⁸ Beneo GR (Orafti); ⁹ Beneo P-95 (Orafti).

¹ Leite Tipo A *light* (Xandô, São Paulo, Brasil); ² Cloreto de cálcio PA (Labsynth, Diadema, Brasil, 0,25 g/L de leite); ³ culturas do tipo DVS, adição de acordo com as variáveis descritas na Tabela 1; ⁴ Coagulante comercial HA-LA 1175 (Quimosina em pó, produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori*, Christian Hansen, Valinhos, Brasil, 30 mg/L de leite).

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

* Ingredientes e proporções descritos na Tabela 2.

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

3.2 Períodos de armazenamento e amostragem dos queijos *petit-suisse*

Os produtos foram armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C). As determinações dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das amostras provenientes de cada uma das 3 repetições de cada formulação (QC, QP e QS) foram realizadas em duplicata e a determinação do perfil instrumental de textura em quintuplicata, no dia seguinte à fabricação do produto final (1 dia) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. O período de 28 dias, inferior à vida de prateleira de *petit-suisse* comercializado, foi determinado mediante estudos prévios com alimentos refrigerados adicionados de culturas de micro-organismos (CARDARELLI et al., 2008; PEREIRA et al., 2010). 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 provadores. A determinação da composição centesimal do alimento foi feita em triplicata, a partir de amostras mantidas congeladas.

O ensaio de sobrevivência sob as condições gastrintestinais simuladas *in vitro* foi realizado a partir de amostras provenientes de uma única produção de QS e QP. Para QC não foi realizado o ensaio de sobrevivência, uma vez que não apresentava a cultura probiótica na formulação.

3.3 Determinações de pH

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.2, foram realizadas as determinações de pH, em medidor de pH Orion modelo Three Stars (Thermofisher Scientific, Waltham, EUA), com a utilização eletrodo tipo penetração, modelo 2A04-GF (Analyser, São Paulo, Brasil). O pH também foi monitorado ao longo da elaboração dos produtos.

3.4 Determinação da composição centesimal e cálculo do valor energético total (VET) dos queijos

A partir das amostras mantidas congeladas no dia seguinte à sua elaboração (dia 1), conforme descrito no item 3.2, foram realizadas as análises de determinação do teor de umidade (a partir de 5 g de amostra, em estufa a vácuo a 70 °C), teor de cinzas (a partir de 2 g de amostra), de gordura (através do método de Gerber) e de proteínas (através do método de Kjeldahl, para nitrogênio total), realizadas segundo

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). O teor de carboidratos foi calculado por diferença para obtenção de 100% no total.

Os teores de macronutrientes foram convertidos em quilocalorias por meio dos fatores de Atwater e da energia oriunda da inulina e oligofrutose [(4 × g proteínas) + (4 × g carboidratos) + (9 × g lipídios totais) + (1,5 × g frutanos totais)] para determinar o valor energético total (VET) médio queijos QP, QS e QC (ROBERFROID, 1999; 2005; ANVISA, 2003).

3.5 Determinação do perfil de textura instrumental

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.2, o perfil de textura foi determinado, através de teste de dupla penetração em 50 g de amostra armazenada em recipientes plásticos de polipropileno (descritos no item 3.1), realizado imediatamente após retirar a amostra da refrigeração, utilizando cilindro de acrílico P/25P com 25 mm de diâmetro, distância e velocidade de 10 mm e de 1 mm/s, respectivamente, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). Os dados foram coletados através do programa "Texture Expert for Windows" (Stable Micro Systems) e foram analisados os atributos dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade, em quintuplicata para cada período (1, 7, 14, 21 e 28 dias).

3.6 Análises microbiológicas dos queijos

Para a análise e quantificação dos micro-organismos probióticos e da cultura *starter* nos queijos (viabilidade dos micro-organismos), foram utilizados métodos independentes de cultivo, paralelamente a métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo, decorrido o período de armazenamento descrito no item 3.2.

3.6.1 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura *starter*, utilizando métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo

Porções de 25 g do produto (retirados de 2 embalagens distintas, em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um *Bag Mixer* (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente. As contagens das populações de *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e

S. thermophilus foram realizadas, utilizando a técnica de *pour plate* em meios seletivos para cada micro-organismo (Tabela 3). Ressalta-se que foram contabilizadas colônias de morfologia característica de cada micro-organismo.

Tabela 3. Condições de cultivo empregadas para as análises microbiológicas por métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo.

Micro-organismo	Meio de cultura	Condições de Incubação	Referência
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Ágar MRS formulado ¹ com a substituição de glicose por maltose	37 °C/ aerobiose	DAVE & SHAH, 1996; VINDEROLA & REINHEIMER, 1999; SHAH, 2000 INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995
<i>B. animalis</i> BB-12	Ágar LP-MRS ²	37 °C/ anaerobiose ⁴	LAPIERRE, UNDELAND & COX, 1992; VINDEROLA & REINHEIMER, 1999
<i>S. thermophilus</i>	Ágar M17 ³ adicionado de lactose	37 °C/ aerobiose	RICHTER & VEDAMUTHU, 2001

¹ Ágar MRS: ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) formulado, adicionado de 40 mL/L de solução estéril de maltose (Oxoid) a 50% (m/v), como principal fonte de carboidrato.

² Ágar LP-MRS: ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid) suplementado com propionato de sódio a 3 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e cloreto de lítio a 2 g/L (Merck, Darmstadt, Alemanha).

³ Ágar M17: ágar M17 (Oxoid), adicionado de 50 mL/L de solução estéril de lactose (Oxoid) a 10% (m/v).

⁴ incubação em anaerobiose (*Anaerogen* Sistema de Anaerobiose).

3.6.2 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura *starter* nos queijos, utilizando método independente de cultivo (qPCR)

Extração do DNA bacteriano diretamente do queijo *petit-suisse*

Para a quantificação dos micro-organismos por métodos independentes de cultivo, os DNAs bacterianos de *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* BB-12 e *S. thermophilus* foram isolados dos queijos *petit-suisse*, baseando-se na metodologia descrita por ZOETENDAL et al. (2006), para isolamento de DNA a partir de fezes humanas, uma vez que melhores resultados foram obtidos na extração de DNA a partir de queijo *petit-suisse* (VILLARREAL, FRANCO & SAAD, 2009). Para a extração de DNA, porções de 2 g de queijo, em triplicata, foram adicionadas de 18 mL de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear, Diadema,

São Paulo, Brasil) 2% (m/v), pré-aquecido a 45 °C, e incubados em banho de água a 45 °C, por 30 minutos. Em seguida, foram homogeneizados em *Bag Mixer* (Interscience) por 3 minutos e centrifugados a 4 °C (Centrífuga Refrigerada 2-16 PK, Sigma, Osterode am Harz, Alemanha), por 10 minutos a 8000 g. O sobrenadante foi descartado e, com o auxílio de hastes de algodão estéreis (SWAB), foi removida a gordura da parede do tubo. Foi adicionado 1 mL de solução tampão (pH 8) Tris-EDTA (TE) e a amostra foi centrifugada a 7000 g a 4 °C, por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuscitado em 500µL de solução TE e transferido para um tubo com rosca de 2 mL contendo 0,3 g de esferas de zirconia (Biospec Products Inc., Bartlesville, EUA) e 150µL de fenol-TE (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brasil).

As amostras foram submetidas a rompimento mecânico, usando disruptor celular (*Fast Prep*, MP Biomedicals, Solon, EUA) por 3 pulsos a 5,5 m/s e, em seguida, a várias etapas de extração com 150 µL de fenol e 150 µL de uma solução cloroformio:álcool isoamílico (24:1 v/v) (Invitrogen-Life Technologies), até obtenção de uma interface clara. O DNA foi precipitado com etanol e armazenado a -20 °C.

A concentração e qualidade do DNA genômico isolado foi determinada em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

PCR em tempo real (qPCR)

Para as análises de quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* por métodos independentes de cultivo, foi empregada a técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando-se termociclador de PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems-Life Technologies, São Paulo, Brasil) e os reagentes *SYBR® Green* PCR *Master Mix* (Applied Biosystem-Life Technologies) para *L.acidophilus* LA-5 e *S. thermophilus* e TaqMan (Applied Biosystem-Life Technologies) para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

A amplificação do DNA bacteriano foi realizada, utilizando-se *primers* cepa-específicos e sondas, no caso dos ensaios TaqMan (Tabela 4). As condições da reação foram otimizadas, quando necessário, o que incluiu as concentrações dos *primers*, tempos e temperaturas de reação (Tabela 5). A fim de melhorar a eficiência da reação, utilizou-se Albumina Sérica Bovina (BSA, Applied Biosystem-Life

Technologies) em concentração 0,1 µg/µl, bem como diluições 1:100 ou 1:000 das amostras, conforme a concentração de DNA da amostra.

Para a quantificação, utilizou-se o método de quantificação absoluta, com uma curva padrão de 6 a 8 pontos (10^8 ou $10^6 - 10^1$ cópias), elaborada a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico de cultura pura para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ou a partir de 16S rDNA de cultura pura, para *L. acidophilus* LA-5 e *S. thermophilus*, uma vez que os *primers* foram desenhados para as regiões 23S, 16S e 16S rRNA, respectivamente. O Ct (do inglês *Cycle Threshold*) obtido de cada amostra foi comparado aos Ct obtidos na curva padrão, para obtenção do número de cópias das amostras.

O número de cópias/g de queijo *petit-suisse* encontrado foi dividido por 4, no caso de *L. acidophilus* LA-5 e por 6, para *S. thermophilus*, para a equivalência em número de células/g do produto, uma vez que 4 e 6 são o número de cópias do gene 16S rRNA presente nos genomas de referência de *L. acidophilus* NCFM e *S. thermophilus* CNRZ 1066, respectivamente (KLAPPENBACH et al., 2001).

Tabela 4. Lista de *primers* utilizados no método de quantificação por técnica independente de cultivo (qPCR).

Micro-organismo alvo	<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	Referência
<i>S. thermophilus</i>	THERMFOR	ACGCTGAAGAGAGGA	TABASCO et al., 2007
	THERMREV	AATTGCCCTTTCAAATA	
<i>L. acidophilus</i>	ACIDFOR	AGCGAGCTGAACCAACAGAT	TABASCO et al., 2007
	ACIDREV	AGGCCGTTACCCTACCAACT	
<i>B. animalis</i> BB-12	BAL-23S-F	CAGGTGGTCTGGTAGAGTATACCG	TAIPALE et al., 2011
	BAL-23S-R	ACGGCGACTTGCGTCTTG	
	BAL-23S-sonda	FAM-CGCCCACGACCCGCAAG-TAMRA	

Tabela 5. Condições utilizadas nas reações de qPCR para a quantificação dos micro-organismos.

Primers	Concentração de primer	Programa de reação		
		Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
THERMFOR	400 nM	1	50	2 minutos
			95	10 minutos
THERMREV	400 nM	40	95	10 segundos
			60	30 segundos
ACIDFOR	400 nM	1	50	2 minutos
			95	10 minutos
ACIDREV	400 nM	40	95	10 segundos
			60	30 segundos
BAL-23S-F	300 nM	1	50	2 minutos
BAL-23S-R	300 nM		95	10 minutos
BAL-23S-sonda	250 nM	40	95	15 segundos
			60	1 minuto

3.7 Monitoramento dos micro-organismos indicadores de contaminação e pesquisa de patógenos

Para a contagem de micro-organismos indicadores de contaminação, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas PetrifilmTMEC (3M Microbiology, St. Paul, EUA), para a determinação de coliformes e de *Escherichia coli*, e para 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, amostras congeladas das formulações QC, QP e QS, no dia seguinte à produção, foram submetidas à contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva e à investigação da presença de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp., de acordo com as exigências das legislação para “queijos de muita alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundante”, a qual estabelece os limites permitidos para cada grupo de micro-organismos (ANVISA, 2001). Essas análises foram realizadas com a consultoria do Laboratório de Microbiologia de

Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, seguindo a metodologia descrita por DOWNES & ITO (2001).

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid) adicionado de telúrio de potássio 1% (10 mL/940 mL de meio) e gema de ovo (50 mL/940 mL de meio). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas (DOWNES & ITO, 2001).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., porções de 25 g de produto, retiradas em condições de assepsia, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada 2% (pH 7,0 $\pm$ 0,2 a 25 °C) e incubadas a 35-37 °C durante 24 horas, para a etapa de pré-enriquecimento. Alíquotas de 0,1 mL e de 1 mL das diluições pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid) e 10 mL de caldo tetracionato (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) e incubadas a 35-37 °C, por 24 horas. Quando necessário, as colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para identificação (DOWNES & ITO, 2001).

Para pesquisa de *Listeria monocytogenes*, porções de 25 g de 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 (Oxoid) e incubadas a 35 °C por até 48 h para serem submetidas à identificação bioquímica, quando necessário.

3.8 Sobrevivência dos probióticos incorporados nos queijos frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*

Nos queijos *petit-suisse* (QP e QS), foi realizada avaliação da sobrevivência dos micro-organismos probióticos frente às condições gástricas e entéricas simuladas, conduzida empregando-se um modelo *in vitro* que utiliza sucos gástricos

e entéricos simulados e enzimas do TGI, adaptado de LISERRE, RÉ e FRANCO (2007) e BURITI, CASTRO e SAAD (2010), com modificações.

Para cada dia de armazenamento do produto (1, 7, 14, 21 e 28 dias), foi realizada análise com 3 amostras (3 embalagens distintas, provenientes de um mesmo lote), sendo que porções de 25 g de cada amostra das formulações QP e QS foram misturadas a 225 mL de uma solução de NaCl 0,85% (m/v) (diluição 10^{-1}), utilizando-se um *Bag Mixer* (Interscience).

Foram retirados volumes de 10 ml de cada uma das 3 diluições e transferidos para 3 frascos estéreis, totalizando 9 frascos (3 diluições x 3 fases da amostra) e o pH foi ajustado para o intervalo 2,09 a 2,67 com HCl 1N. Foram adicionadas as enzimas pepsina (pepsina obtida de mucosa gástrica suína, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e lipase (Amano lipase obtida de *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company, EUA) em concentrações 3g/L e 0,9 mg/L, respectivamente.

Todos os frascos foram incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil), durante 2 horas (fase gástrica). Após este período, o pH das amostras foi ajustado para o intervalo entre 4,50 e 5,08 com a adição de solução alcalina de pH 12 (150 ml de NaOH 1N; 11,16 g de NaH_2PO_4 e água destilada suficiente para completar 1L). Bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina obtida de pâncreas suíno, Sigma-Aldrich) foram adicionadas em concentração de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram, novamente, incubadas a 37 °C, mantendo-se a agitação de 150 rpm por mais 2 horas (fase entérica 1).

A próxima e última etapa consistiu em elevar o pH entre 6,03 e 6,86, utilizando a mesma solução alcalina utilizada na etapa anterior. Foram adicionadas, novamente, bile e pancreatina, a fim de manter as concentrações das enzimas na solução (10 g/L e 1 g/L, respectivamente). As amostras foram, novamente, incubadas a 37 °C por 2 horas sob agitação (fase entérica 2). O tempo total de duração do ensaio foi de 6 horas.

Para a análise e quantificação dos micro-organismos probióticos no ensaio de sobrevivência *in vitro*, foram utilizados métodos independentes de cultivo, paralelamente a métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo.

3.8.1 Monitoramento dos micro-organismos probióticos, utilizando métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo

Para a quantificação por método convencional de semeadura em profundidade em ágar seletivo, alíquotas de 1 mL foram retiradas previamente (fase inicial) e após 2 (fase gástrica), 4 (fase entérica 1) e 6 (fase entérica 2) horas do início do ensaio *in vitro* e foram feitas diluições decimais subsequentes para a contagem dos micro-organismos probióticos. Foram utilizadas as condições de cultivo já descritas na Tabela 3. Para cada fase de análise e cada micro-organismo probiótico foram utilizadas 3 amostras em duplicata de análise.

3.8.2 Monitoramento dos micro-organismos probióticos e da cultura *starter* nos queijos, utilizando métodos independentes de cultivo

Para a quantificação através de métodos independentes de cultivo, foram realizadas duas metodologias: com utilização de reagente *Propidium Monoazide* (PMA, Uniscience do Brasil IND, São Paulo, Brasil) e sem utilização do reagente PMA, conforme descrito a seguir.

Quantificação por método independente de cultivo sem PMA

Para a quantificação da fase inicial, 2 g de queijo foram adicionados de 18 mL (diluição 10^{-1}) de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear, Diadema, Brasil) 2% (m/v) pré-aquecido a 45 °C. Para as fases gástrica, entérica 1 e entérica 2, 3 mL de cada fase foram adicionados de 27 mL (diluição 10^{-1}) de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear) 2% (m/v) pré-aquecido a 45 °C. As amostras foram incubadas em banho de água a 45 °C, por 30 minutos.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em *Bag Mixer* (Interscience), por 3 minutos, e centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 8000 g. O sobrenadante foi descartado e, com o auxílio de hastes de algodão estéreis (SWAB), foi removida a gordura da parede do tubo. Foi adicionado 1 mL de solução tampão (pH 8) TE e a amostra foi centrifugada a 7000 g a 4 °C, por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuscitado em 500 µL de solução TE.

A extração do DNA bacteriano e quantificação pela técnica de qPCR prosseguiu, conforme descrito no item 3.6.2, com os *primers* e condições de reações

mencionadas nas Tabelas 4 e 5. As análises foram realizadas nos dias 1, 14 e 28 para o ensaio de sobrevivência *in vitro*.

Quantificação por método independente de cultivo com PMA

Para a quantificação da fase inicial, 2 g de queijo foram adicionados de 18 mL (diluição 10^{-1}) de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear) 2% (m/v) pré-aquecido a 45 °C. Para as fases gástrica, entérica 1 e entérica 2, 3 mL de cada fase foram adicionados de 27 mL (diluição 10^{-1}) de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH 7,5, Nuclear) 2% (m/v) pré-aquecido a 45 °C. As amostras foram incubadas em banho de água a 45 °C, por 30 minutos. Em seguida, foram homogeneizados em *Bag Mixer* (Interscience) por 3 minutos e centrifugados a 4 °C, por 10 minutos a 8000 g. O sobrenadante foi descartado e, com o auxílio de hastes de algodão estéreis (SWAB), foi removida a gordura da parede do tubo. Foi adicionado 1 mL de solução tampão (pH 8) TE e a amostra foi centrifugada a 7000 g a 4 °C, por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuspensionado em 500µL de solução TE e armazenado a -20 °C.

Para o tratamento com PMA, estudos publicados na literatura e ensaios preliminares (dados não mostrados) com utilização de PMA auxiliaram na definição das condições para este ensaio (NOCKER, CHEUNG & CAMPER, 2006; GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; MIKKELSON, LEE & PONCE, 2011).

As amostras do ensaio *in vitro* referentes aos dias 1, 14 e 28 de armazenamento do queijo *petit-suisse*, armazenadas a -20 °C foram descongeladas, centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 5000 g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 498,75 µL de PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,4, Sigma-Aldrich) e 1,25 µL de solução de PMA a 20 mM, a fim de se obter concentração final de 50µM de PMA nos tubos com as amostras.

Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 5 minutos, com eventual mistura, de modo a permitir a penetração do PMA em células mortas. Posteriormente, para a ligação do PMA ao DNA bacteriano, as amostras foram expostas à luz (lâmpada halógena de 650 W, FCW 120 V, GE Lighting, General Electric Co., Cleveland, EUA), por 15 minutos, dispostas horizontalmente a uma distância de 20 cm entre os tubos e a lâmpada, mantidas em gelo e misturadas ocasionalmente para prevenir o aquecimento excessivo.

Após a foto-indução as amostras foram centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 10000 g e lavadas com PBS para remoção do PMA inativo.

O *pellet* foi ressuspendido em 500 µL de TE para extração de DNA, conforme protocolo habitual e o DNA obtido foi utilizado nas reações de qPCR para quantificação dos micro-organismos probióticos, como descrito no item 3.6.2, com os *primers* e condições de reações já apresentadas nas Tabelas 4 e 5.

3.8.3 Cálculo da Taxa de Sobrevivência

Para a comparação da análise da sobrevivência dos micro-organismos probióticos após o ensaio frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, entre as formulações QP e QS, foi utilizada a taxa de sobrevivência adaptada de WANG et al. (2009) e GUO et al. (2009). A taxa de sobrevivência foi calculada, de acordo com a equação:

$$\text{Taxa de Sobrevivência (\%)} = \frac{N_{\text{final}}}{N_{\text{inicial}}} \times 100$$

Onde N_{final} = quantidade de micro-organismo probiótico obtida após o ensaio de sobrevivência sob condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* (fase entérica II) e N_{inicial} = quantidade de micro-organismo probiótico obtida antes do ensaio.

3.9 Análise sensorial

A avaliação sensorial dos produtos desenvolvidos no presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme consta no Ofício CEP/FCF/108/2011 (Anexo A).

Nos Anexos B e C estão inclusos, respectivamente, o modelo da ficha para o teste de aceitação e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovados e utilizados.

A avaliação sensorial dos produtos estudados foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, de acordo com os tempos e as condições de armazenamento descritos no item 3.2, através de teste de aceitabilidade, utilizando escala hedônica de 9 pontos, com variação de desgostei

muitíssimo (1 ponto) à gostei muitíssimo (9 pontos). Participaram deste estudo 354 voluntários adultos (provadores não treinados), de ambos os sexos. Esses voluntários saudáveis eram alunos de graduação e de pós-graduação, docentes e funcionários da Universidade de São Paulo ou outros voluntários saudáveis interessados em participar do estudo. Para a triagem dos provadores, foi aplicado o critério de inclusão, a saber: possuir entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos. Já os critérios de exclusão adotados incluíram: possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância a alimentos ou doença crônica (como diabetes, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão ou outras); estar fazendo tratamento médico; estar gripado, resfriado ou indisposto; ter entrado em contato, há menos de 1 hora, com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte.

As análises tiveram em vista a comparação nos diferentes períodos de armazenamento da amostra, de acordo com o período necessário para a estabilização dos componentes da formulação, o período de uma possível comercialização de produtos similares disponíveis no comércio, além da segurança dos provadores.

Para a avaliação sensorial, amostras de aproximadamente 20 g das diferentes formulações (QC, QP e QS), codificadas com 3 algarismos, aleatoriamente, foram oferecidas aos provadores monadicamente, em um total de 9 sessões. As amostras foram servidas em potes devidamente higienizados, em 3 períodos distintos (7, 14 e 21 dias). Cada formulação foi apresentada a 50 provadores não treinados (LAWLESS & HEYMANN, 1999).

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 3 formulações de queijo *petit-suisse* (QP, QS e QC) e 5 tempos (1, 7, 14, 21 e 28 dias após o processamento).

Foram realizadas estatísticas descritivas (médias e desvios padrão) para cada conjunto de dados obtidos nas análises. As comparações entre dias de armazenamento, formulações de queijo *petit-suisse* (QP, QS e QC) e fases do ensaio de sobrevivência dos micro-organismos probióticos sob condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* foram realizadas através de modelos de análise de variância (ANOVA), seguidos do teste de médias de Tukey. Para a comparação

entre métodos aplicou-se teste t de Student para amostras independentes, com variâncias desiguais. A homogeneidade de variância entre as formulações e dias de armazenamento foi avaliada através do teste de Levene. O nível de confiança utilizado nas análises foi de 95%. Os programas estatísticos utilizados nas análises foram o XLSTAT 2013 (Addinsoft SARL, New York, EUA) e o MINITAB 14 (MINITAB Inc., State College, EUA).

Adicionalmente, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, para averiguar correlação entre os métodos de quantificação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Valores de pH

Os valores de pH ao longo do período de armazenamento dos queijos *petit-suisse* probiótico, simbiótico e controle estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pH do queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante o período de armazenamento a 4 °C.

Período de armazenamento (dias)	Formulações de queijo <i>petit-suisse</i>		
	QC	QP	QS
1	4,99 ± 0,12 ^{Aa}	4,62 ± 0,07 ^{Ba}	4,56 ± 0,19 ^{Ba}
7	4,95 ± 0,05 ^{Aa}	4,40 ± 0,13 ^{Ba}	4,47 ± 0,13 ^{Ba}
14	4,91 ± 0,07 ^{Aa}	4,43 ± 0,09 ^{Ba}	4,52 ± 0,17 ^{Ba}
21	5,04 ± 0,08 ^{Aa}	4,47 ± 0,13 ^{Ba}	4,49 ± 0,10 ^{Ba}
28	4,58 ± 0,14 ^{Ab}	4,47 ± 0,11 ^{Aa}	4,47 ± 0,12 ^{Aa}

Valores em média ± desvio padrão.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, indicam diferenças significativas entre os dias de armazenamento ($p < 0,05$).

Durante o período de armazenamento, uma redução de pH é esperada em queijos e outros produtos lácteos fermentados, visto que trata-se de um processo natural da fermentação da lactose pelos micro-organismos *starter* e probióticos presentes no produto, produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos (MARUYAMA et al., 2006). De fato, no presente estudo, observou-se uma tendência

à redução do pH em todas as formulações estudadas, durante o período de armazenamento. No entanto, somente no 28º dia houve uma redução estatisticamente significativa, apenas para o queijo controle QC ($p < 0,05$).

Entre as formulações, QC apresentou valores de pH mais elevados, durante todo período de armazenamento ($p < 0,05$), exceto no 28º dia, quando não houve diferença nos valores de pH das formulações estudadas ($p > 0,05$).

A maior redução de pH nas formulações QP e QS pode estar relacionada à adição de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5, além da própria cultura *starter*, uma vez que esses micro-organismos são capazes de conduzir e acelerar o processo de fermentação (SAAD et al., 2011). A esse respeito, na pós-acidificação, AO et al. (2012) observaram que cepas de *Lactobacillus* apresentaram atividade mais expressiva, quando comparadas a cepas de *Enterococcus* e *Streptococcus* em leites fermentados.

Ao compararem o pH de queijo *petit-suisse*, PEREIRA et al. (2010) observaram pH inicial discretamente superior na formulação somente com cultura *starter* de *S. thermophilus* (4,81), comparada à formulação acrescida de *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04 (4,70). Entretanto, segundo os autores, não foram constatadas diferenças significativas entre as formulações, contrapondo-se aos resultados obtidos no presente estudo entre o pH da formulação controle e das formulações adicionadas de probióticos, em 21 dias de armazenamento.

Por outro lado, embora, não tenham sido encontradas diferenças significativas entre as formulações simbiótica e probiótica no presente estudo ($p > 0,05$), CARDARELLI et al. (2008) observaram diferença de pH entre formulações de queijos *petit-suisse* simbióticos e probióticos, justificada pela proporção de lactose nas formulações. Segundo os autores, a ausência de ingredientes prebióticos na formulação de queijo probiótico implica que neste há proporcionalmente mais queijo e, portanto, mais lactose a ser utilizada como substrato na produção de ácidos orgânicos.

O pH da matriz alimentícia é um fator importante na sobrevivência do micro-organismo probiótico, sobretudo durante a passagem pela fase gástrica do trânsito gastrointestinal. Matrizes alimentícias com maior valor de pH apresentam maior

capacidade tamponante, a qual pode elevar o pH gástrico e aumentar a estabilidade dos probióticos (KAILASAPATHY & CHIN, 2000; CRUZ et al., 2011).

No alimento, combinações de probióticos com ingredientes que atuam sinergicamente e características de pH parecem ser atributos importantes para potencializar a sobrevivência de probióticos. Portanto, a seleção cuidadosa da matriz alimentar, considerando a acidez, neutralidade ou alcalinidade, é fundamental e deve ser considerada no desenvolvimento de produtos com probióticos (RANADHEERA, BAINE & ADAMS, 2010).

5.2 Composição centesimal e valor energético total (VET) dos queijos

A composição centesimal obtida para as formulações estudadas estão apresentadas na Tabela 7.

Como esperado, observou-se um percentual superior a 60% de umidade em todos os queijos estudados, uma vez que o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo *Petit-Suisse* (ANVISA, 2000) identifica o queijo *petit-suisse* como queijo de muito alta umidade, superior a 55%. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos da Universidade de São Paulo (TBCAUSP, 2008), os valores percentuais de umidade dos queijos *petit-suisse* disponíveis no mercado variam de 65% a 68%.

Os valores encontrados de proteínas em todas as formulações estudadas (médias de 14,23, 15,88 e 16,74%, para QS, QC e QP, respectivamente) foram bastante superiores aos valores de queijos *petit-suisse* disponíveis no mercado, os quais apresentam cerca de 6% de proteínas (TBCAUSP, 2008). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit-Suisse*, estabelece um limite mínimo de proteína de 6%, porém não determina limite máximo.

Observou-se valor percentual de proteína em QS ligeiramente inferiores, comparados aos encontrados em QP e QC. A menor proporção de queijo *quark* e creme de leite na formulação QS, justificam o valor inferior, uma vez que consistem as principais fontes proteicas do produto.

Similarmente ao presente estudo, CARDARELLI et al. (2008) observaram valores de umidade em *petit-suisse* de morango probiótico e simbiótico superiores a 60%. Em contrapartida, encontraram valores de proteína entre 8,89 e 9,93%.

É possível que esta diferença esteja relacionada ao coagulante utilizado na produção da massa-base de queijo *quark*. Para o presente estudo, utilizou-se quimosina de origem microbiana, produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori*, enquanto que formulações desenvolvidas previamente pelo grupo de pesquisa (CARDARELLI et al., 2008; PEREIRA et al., 2010) utilizaram quimosina de origem bovina. Nesse sentido, o processo de produção do queijo *quark* requer a coagulação do leite por meio da ação da quimosina, para a agregação das micelas de κ -caseína, formando a coalhada. Logo, diferentes coagulantes podem acarretar em maior ou menor agregação o que, em consequência, influenciar na concentração de proteínas (CRUZ et al., 2011).

Os valores de lipídios (entre 2,75 e 3,00%) encontram-se inferiores, enquanto que os valores de carboidratos (cerca de 18% para QC e QP, não suplementadas com fibra prebiótica) encontram-se similares aos valores de queijo *petit-suisse* comercial, representados por 4,60% para lipídios e 19,89% para carboidratos.

O maior percentual de carboidratos na formulação QS deve-se a adição dos frutanos. Entretanto, por serem carboidratos não metabolizados por enzimas do TGI, fornecem menor energia e, em consequência, determinou um menor valor energético total para esta formulação, inclusive comparado ao produto comercial que fornece 147 kcal/100 g (TBCAUSP, 2008).

Tabela 7. Composição centesimal e valor energético das formulações QC (queijo controle), QP (queijo probiótico) e QS (queijo simbiótico).

	Composição centesimal (g/100 g)		
	QC	QP	QS
Cinzas (g)	1,80 ± 0,00	1,41 ± 0,00	1,24 ± 0,01
Umidade (g)	61,35 ± 0,07	60,74 ± 0,03	61,64 ± 0,45
Proteínas (g)	15,88 ± 0,70	16,74 ± 0,08	14,23 ± 1,12
Lipídios (g)	2,75 ± 0,35	3,00 ± 0,00	2,75 ± 0,35
Carboidratos (g)	18,23 ± 0,42	18,12 ± 0,05	20,14 ± 1,93*
Valor Energético (kcal)	161,19 ± 2,05	166,42 ± 0,12	138,82 ± 0,09

Valores em média ± desvio padrão.

(*) 9,36 g correspondentes aos frutanos: inulina e FOS [estimativas baseadas na informação do fornecedor (Orafti) para os frutanos (Beneo GR e Beneo P-95). utilizados no presente estudo].

[(4 × g proteínas) + (4 × g carboidratos) + (9 × g lipídios totais) + (1,5 × g frutanos totais)].

5.3 Perfil de textura instrumental dos queijos

Os valores obtidos na análise de textura instrumental ao longo dos períodos de armazenamento dos queijos *petit-suisse* controle, probiótico e simbiótico estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Perfil de textura instrumental dos queijos QC, QP e QS, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, sob refrigeração a 4 °C.

Parâmetros de Textura	Período de armazenamento (dias)	Queijos <i>petit-suisse</i>		
		QC	QP	QS
Dureza (N)	1	4,421 ± 0,402 ^{Ac}	1,067 ± 0,056 ^{Ba}	0,628 ± 0,049 ^{Cc}
	7	5,664 ± 0,416 ^{Aab}	1,061 ± 0,066 ^{Ba}	0,603 ± 0,026 ^{Bc}
	14	5,956 ± 0,439 ^{Aa}	1,018 ± 0,059 ^{Ba}	0,801 ± 0,053 ^{Bb}
	21	5,784 ± 0,424 ^{Aa}	0,863 ± 0,051 ^{Ba}	0,847 ± 0,051 ^{Bab}
	28	5,100 ± 0,419 ^{Ab}	0,788 ± 0,072 ^{Ba}	0,925 ± 0,082 ^{Ba}
Coesividade	1	0,380 ± 0,110 ^{Aa}	0,390 ± 0,020 ^{Aa}	0,460 ± 0,010 ^{Aa}
	7	0,300 ± 0,070 ^{Ca}	0,370 ± 0,010 ^{Bb}	0,470 ± 0,030 ^{Aa}
	14	0,320 ± 0,010 ^{Ca}	0,370 ± 0,020 ^{Bb}	0,440 ± 0,030 ^{Aab}
	21	0,330 ± 0,030 ^{Ca}	0,370 ± 0,010 ^{Bb}	0,410 ± 0,030 ^{Ab}
	28	0,300 ± 0,080 ^{Ba}	0,380 ± 0,010 ^{Aab}	0,400 ± 0,020 ^{Ab}
Adesividade (N s)*	1	7,600 ± 1,270 ^{Aa}	2,040 ± 0,230 ^{Ba}	1,300 ± 0,160 ^{Bb}
	7	9,650 ± 1,780 ^{Aab}	2,030 ± 0,220 ^{Ba}	1,240 ± 0,070 ^{Bb}
	14	11,090 ± 0,540 ^{Ab}	2,010 ± 0,200 ^{Ba}	1,870 ± 0,200 ^{Ba}
	21	9,610 ± 3,270 ^{Aab}	1,530 ± 0,160 ^{Bb}	1,970 ± 0,130 ^{Bba}
	28	8,760 ± 1,470 ^{Aab}	1,380 ± 0,220 ^{Bb}	2,100 ± 0,210 ^{Ba}
Elasticidade	1	0,870 ± 0,120 ^{Aa}	0,920 ± 0,020 ^{Aa}	0,910 ± 0,010 ^{Aa}
	7	0,810 ± 0,210 ^{Aa}	0,920 ± 0,010 ^{Aa}	0,910 ± 0,010 ^{Aa}
	14	0,910 ± 0,010 ^{Aa}	0,910 ± 0,010 ^{Aab}	0,900 ± 0,070 ^{Aa}
	21	0,860 ± 0,140 ^{Aa}	0,890 ± 0,010 ^{Ab}	0,930 ± 0,010 ^{Aa}
	28	0,820 ± 0,240 ^{Aa}	0,920 ± 0,010 ^{Aa}	0,920 ± 0,020 ^{Aa}
Gomosidade (N)	1	1,710 ± 0,610 ^{Aa}	0,420 ± 0,020 ^{Ba}	0,290 ± 0,020 ^{Bb}
	7	1,590 ± 0,720 ^{Aa}	0,320 ± 0,170 ^{Ba}	0,280 ± 0,010 ^{Bb}
	14	1,900 ± 0,180 ^{Aa}	0,370 ± 0,020 ^{Ba}	0,350 ± 0,010 ^{Ba}
	21	1,880 ± 0,170 ^{Aa}	0,280 ± 0,100 ^{Ba}	0,350 ± 0,020 ^{Ba}
	28	1,520 ± 0,450 ^{Aa}	0,260 ± 0,120 ^{Ba}	0,370 ± 0,020 ^{Ba}

Valores em média ± desvio-padrão. (*) Valores em módulo. ^{A,B} Letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$). ^{a,b} Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, indicam diferenças significativas entre os dias para cada parâmetro de textura ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros de textura utilizados, a dureza consiste na força necessária para comprimir o queijo entre a língua e o palato para deformá-lo (FOX et al., 2000). No presente trabalho, QC apresentou maior dureza, enquanto que, QP e QS não houve diferença significativa para este mesmo parâmetro, exceto ao 1º dia de armazenamento ($p < 0,05$).

Dentre as formulações acrescidas de probióticos, observou-se tendência a valores inferiores em QS, entretanto, somente ao 1 dia de armazenamento esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Adicionalmente, durante o período de armazenamento, observou-se um aumento nos valores de dureza em QC até 21 dias e QS, até 28 dias, enquanto que em QP, os valores permaneceram estáveis durante todo período de armazenamento.

É desejável que, ao longo do armazenamento, a dureza mantenha-se estável, uma vez que este é um indicativo de que o produto permanece semelhante ao produto recém-fabricado. Especialmente para manter as características físico-químicas e, conseqüentemente, sensoriais, a estabilidade é um atributo desejável (MARUYAMA et al., 2006). Entretanto, no presente estudo, observou-se que somente QP apresentou estabilidade no parâmetro de dureza, enquanto que em QC e QS observou-se que, comparados ao 1º dia de armazenamento, os valores de dureza foram, respectivamente, 0,679 e 0,297 superiores no 28º dia de armazenamento ($p < 0,05$).

Similarmente, CARDARELLI, FEBBO e SAAD (2003) e BURITI, CASTRO e SAAD (2010) observaram valores de dureza superiores ao longo do período de armazenamento em formulações de, respectivamente, queijo *petit-suisse* simbiótico e musse de goiaba acrescidos de creme de leite e inulina. BURITI, CARDARELLI e SAAD (2007) também observaram instabilidade de dureza durante o armazenamento refrigerado (4 °C) em queijos frescos cremosos probiótico e simbiótico, com valores entre 2,6 a 5,4 N superiores, aos 21 dias de armazenamento.

Contrariamente ao observado entre as formulações do presente estudo, esperava-se maior dureza nas formulações QP e QS, uma vez que estas formulações apresentaram menores valores de pH, comparados à QC. Nesse sentido, tem-se que o pH poderia exercer efeitos diretos sobre a textura, já que um

menor pH promoveria uma maior expulsão de soro, e em consequência acarretaria em menor umidade e maior dureza (POWELL, BROOME & LIMSOWTIN, 2003).

Sugere-se que a maior dureza na formulação QC pode estar relacionada à ausência da cultura probiótica. Embora não tenha sido avaliado no presente estudo, é possível que maior proteólise tenha ocorrido nas formulações acrescidas de probióticos, particularmente devido à presença de *Lactobacillus*, uma vez que a atividade proteolítica parece ser mais expressiva em *Lactobacillus* do que em *Streptococcus* (FOX et al., 2000; RAJAGOPAL & SANDINE, 1990). A maior proteólise poderia influenciar diretamente os parâmetros de textura, ao reduzir a firmeza do queijo, já que, de acordo com LIM et al. (1990), o que determina a dureza não é a quantidade de proteínas, mas a forma como a proteína interage com outros componentes estruturais para formar a microestrutura do produto.

Para coesividade, tem-se que é a força utilizada para deformar o queijo antes do mesmo ser perfurado ou sofrer ruptura (FOX et al., 2000). Nos dias 7, 14 e 21 de armazenamento, diferenças, estatisticamente significativas foram constatadas, com maiores valores para QS, seguido de QP e QC ($p < 0,05$). Ao longo do período de armazenamento, observou-se uma discreta redução nos valores, estatisticamente significativa em QS, após o 14º dia e em QP, após o 1º dia ($p < 0,05$).

Os achados para os parâmetros de coesividade corroboram com o estudo de CARDARELLI, FEBBO e SAAD (2003), no qual foram testadas 2 formulações de queijo *petit-suisse* simbiótico, adicionados de inulina ou FOS. Em ambas as formulações, foram observados valores de coesividade próximos a 0,350 e, similarmente ao presente estudo, observou-se uma redução da coesividade ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado. Em musse de goiaba probiótico e simbiótico refrigerado, foram observados valores de coesividade próximos a 0,45, entretanto, não houve variações de coesividade durante o armazenamento (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010).

De acordo com EL-NAGAR et al. (2002), a inulina, em concentrações superiores a 5%, age como um estabilizante devido à sua capacidade hidrofílica, promovendo a formação de uma rede mais coesa e um gel mais estável. A maior coesividade em QS poderia estar relacionada à formação de um gel mais viscoso.

Entretanto, GLIBOWSKI e KOWALSKA (2012), ao analisar o perfil de textura instrumental de *kefir* adicionado de inulina com diferentes graus de polimerização, os

autores observaram que a adição de inulina refletiu em menores valores de coesividade, independente do grau de polimerização.

A adesividade, segundo FOX et al. (2000), refere-se à força requerida para remover o queijo que está aderido na boca (geralmente no palato) durante o processo normal de mastigação. Observaram-se valores de adesividade superiores na formulação QC ($p < 0,05$). Entre QP e QS não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Durante o período de armazenamento, observou-se uma redução (0,66) nos valores de adesividade de QP e, em contrapartida, aumento nos valores de QS (0,70) ($p < 0,05$). Em QC, não foram evidenciadas variações durante o período de armazenamento.

Similarmente ao encontrado em QS no presente estudo, BURITI, CASTRO e SAAD (2010) observaram aumento (de 1,78 para 3,56) dos valores de adesividade em musse de goiaba adicionados de inulina, ao longo do armazenamento refrigerado.

Em relação à elasticidade, esta consiste no grau de retorno do queijo para sua forma original após a deformação (FOX et al, 2000). Os valores obtidos para este parâmetro foram similares entre as formulações de queijo *petit-suisse*. Adicionalmente, não houve diferenças significativas, durante o período de armazenamento estudado.

A gomosidade pode ser definida como densidade que se mantém durante a mastigação (FOX et al, 2000). Assim como observado para dureza e adesividade, a gomosidade dos produtos foi superior em QC quando comparada a QP e QS. Durante o período de armazenamento, os valores de gomosidade mantiveram-se estáveis em QC e QP, enquanto que em QS, após o 7º dia, observaram-se valores mais elevados ($p < 0,05$).

Dado que a gomosidade é uma propriedade diretamente relacionada à dureza, era esperado que valores de gomosidade apresentassem-se superiores em QC. Devido à capacidade de formação de estrutura de gel, a presença de inulina pode ter influenciado no aumento de gomosidade durante o armazenamento.

Em relação à textura frente ao queijo *petit-suisse* comercial, os parâmetros de elasticidade e coesividade obtidos para as formulações QC, QP e QS foram similares ao estudo da textura de queijo *petit-suisse* comercial, analisado por

MATIAS (2011). A adesividade e gomosidade de QP e QS foram similares à textura da amostra comercial com valores de 2,1 e 0,5 N s, respectivamente, enquanto que em QC os valores obtidos para estes parâmetros foram superiores, o que poderia ter influenciado a aceitação sensorial de QC, discutida no item 5.4

5.4 Análise sensorial

Os escores de aceitabilidade das formulações de queijo *petit-suisse*, após 7, 14 e 21 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela 9 (1 = desgostei muitíssimo; 5 = nem gostei nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo). Participaram deste estudo 354 provadores, dos quais 52,3% do sexo feminino e 47,7% do sexo masculino. A média de idade dos provadores foi de 24 anos.

Tabela 9. Escores de aceitabilidade para as formulações QC (queijo controle), QP (queijo probiótico) e QS (queijo simbiótico), após 7, 14 e 21 dias de armazenamento.

Formulação	Período de armazenamento (dias)		
	7	14	21
QC	5,1 ± 2,1 ^{Ba}	4,9 ± 2,1 ^{Ba}	5,3 ± 1,7 ^{Ba}
QP	6,3 ± 1,3 ^{Aa}	6,1 ± 1,6 ^{Aa}	5,9 ± 1,6 ^{Ba}
QS	6,2 ± 1,9 ^{Aab}	6,0 ± 1,7 ^{Ab}	6,8 ± 1,4 ^{Aa}

Valores em média ± desvio padrão.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas, em uma mesma coluna, indicam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas distintas, em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre os dias ($p < 0,05$).

Observou-se uma maior aceitabilidade das formulações adicionadas de micro-organismos probióticos, quando comparadas à formulação controle aos 7 e aos 14 dias de armazenamento ($p < 0,05$). No mesmo período, não houve diferenças estatísticas na média de escores de aceitabilidade entre as formulações adicionadas de micro-organismos probióticos, QP e QS ($p > 0,05$). Entretanto, após 21 dias de armazenamento, o queijo simbiótico apresentou a maior aceitabilidade, quando comparado ao QC e ao QP ($p < 0,05$). Adicionalmente, não foi observada influência relevante do período de armazenamento na aceitabilidade, exceto para QS, para o qual a aceitabilidade aumentou significativamente após 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

Resultados similares foram encontrados por PEREIRA et al. (2010), ao analisar formulações de queijo *petit-suisse* adicionadas das culturas probióticas de

L. acidophilus e *B. animalis* subsp. *lactis*. Os autores observaram maiores escores de aceitabilidade para a formulação acrescida dos probióticos em co-cultura (6,6-6,8), quando comparada à formulação controle, somente com cultura *starter* (5,8-6,0). Do mesmo modo, o período de armazenamento não influenciou nos escores de aceitabilidade.

De fato, a adição de culturas probióticas tem sido correlacionada à melhora de características sensoriais de produtos lácteos fermentados, uma vez que metabólitos produzidos por estes micro-organismos podem contribuir positivamente com as características (PARVEZ et al., 2006). Em bebidas lácteas fermentadas, a adição das culturas probióticas *L. acidophilus* LA-14 resultou em escores de aceitabilidade semelhantes ao presente estudo (CASTRO et al., 2013).

KAILASAPATHY (2006) observou uma maior aceitabilidade de iogurtes adicionados das culturas probióticas de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, quando comparado ao iogurte somente com cultura *starter*. Resultados semelhantes foram encontrados por MARAFON et al. (2011), em iogurtes adicionados de leite em pó desnatado, contendo *B. animalis* subsp. *lactis*.

CORRÊA et al. (2008) observaram uma tendência à maior aceitabilidade na formulação probiótica de manjar de coco, quando comparado à formulação controle, sem adição de probióticos. Efeitos positivos na aceitabilidade foram também encontrados com a adição de *Lactobacillus casei* em sorvete de baunilha (MOHAMMADI, KHOSROKHAVAR & CRUZ, 2011).

Em contrapartida, GOMES et al. (2011) observaram efeitos negativos atribuídos à adição de *L. acidophilus* em queijo Minas Frescal, comparados ao produto convencional, enquanto que ARAGON-ALEGRO et al. (2007) observaram que a adição de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-82 ou inulina em musse de chocolate, não interferiu na preferência dos provadores.

Em relação aos queijos *petit-suisse* comercializados no Brasil, VEIGA et al. (2000) avaliaram diferentes marcas de queijos *petit-suisse*, sem adição de culturas probióticas, e obtiveram médias de escore sensorial entre 6 e 7.

Em relação à presença de prebióticos, o estudo de CARDARELLI et al. (2008) avaliou os escores de aceitabilidade entre formulações de queijo *petit-suisse* adicionadas de *L. acidophilus* Lac-4 e *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04, com diferentes proporções e combinações de inulina, FOS e mel. Embora não tenham sido

constatadas diferenças estatisticamente significativas entre as formulações estudadas por CARDARELLI et al. (2008), observou-se uma tendência à maior aceitação da formulação adicionada de inulina e/ou FOS.

Formulações adicionadas de prebióticos podem apresentar vantagens nutricional e tecnológica. Esta última está relacionada à melhora da qualidade sensorial, devido às características de substituir gorduras, conferir corpo e estabilidade de espuma, atribuídas à inulina, além da propriedade de conferir dulçor, atribuída à FOS (FRANCK, 2002). No presente estudo, a adição de prebióticos foi vantajosa na aceitabilidade, aos 21 dias de armazenamento.

O estudo de GONZÁLEZ-TOMÁS, BAYARRI e COSTELL (2009) elucida a influência de inulina em parâmetros sensoriais de textura em alimentos. Os autores observaram que a adição de inulina com elevado grau de polimerização em leite desnatado apresentou atributos sensoriais de cremosidade (viscosidade) e consistência (dureza) similares ao leite integral, sem inulina.

Assim como foi observado para os queijos aqui estudados, SRISUVOR et al. (2013) observaram maior aceitabilidade de iogurtes adicionados de inulina (1 g/100 ml), com média de escore 5,43, quando comparados a formulação controle, com média de escore de aceitabilidade de 4,62, apenas com os micro-organismos *starter* *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Dentre os critérios utilizados para atribuição de escore (sabor, textura e aparência), o sabor foi mencionado como atributo mais apreciado entre os provadores, enquanto a textura destacou-se como atributo menos apreciado (Figura 3).

Figura 3. Número de citações de atributos positivos (■) e negativos (□) mencionados pelos provadores, considerando todo período de armazenamento e todas as formulações de queijo *petit-suisse* estudadas. Os números nas barras correspondem ao número de vezes que o atributo foi citado.

Tais achados corroboram com o estudo de CARDARELLI et al. (2008) e PEREIRA et al. (2010), no qual o sabor também foi atributo de maior aceitabilidade e a textura o atributo de menor aceitabilidade na análise sensorial de queijos *petit-suisse* probiótico e simbiótico.

5.5 Viabilidade dos micro-organismos probióticos durante o período de armazenamento

Os dados de viabilidade dos micro-organismos probióticos e *starter* nas formulações de queijo *petit-suisse*, ao longo do período de armazenamento, estão apresentados na Tabela 10. Os resultados apresentados foram obtidos através do método de semeadura em ágar seletivo.

Tabela 10. Populações de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Streptococcus thermophilus* (log UFC/g) em formulações de queijo *petit-suisse* probiótico (QP), simbiótico (QS) e controle (QC), armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Quantificação por meio de método dependente de cultivo, por semeadura em ágar seletivo.

Micro-organismos	Período (dias)	Queijos <i>petit-suisse</i>		
		QP	QS	QC
<i>L. acidophilus</i> LA-5	1	8,53 ± 0,04 ^{Aa}	8,61 ± 0,19 ^{Aa}	-
	7	8,50 ± 0,09 ^{Aa}	8,55 ± 0,10 ^{Ab}	-
	14	8,37 ± 0,09 ^{Ab}	8,56 ± 0,18 ^{Ab}	-
	21	7,97 ± 0,39 ^{Ab}	8,12 ± 0,30 ^{Ab}	-
	28	7,46 ± 0,00 ^{Ac}	7,99 ± 0,35 ^{Ab}	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	1	8,94 ± 0,18 ^{Aa}	8,84 ± 0,42 ^{Aa}	-
	7	8,93 ± 0,32 ^{Aa}	8,71 ± 0,16 ^{Aa}	-
	14	8,69 ± 0,38 ^{Aa}	8,86 ± 0,31 ^{Aa}	-
	21	8,18 ± 0,80 ^{Aa}	8,54 ± 0,48 ^{Aa}	-
	28	7,69 ± 0,80 ^{Aa}	8,27 ± 0,70 ^{Aa}	-
<i>S. thermophilus</i>	1	9,90 ± 0,06 ^{Aa}	9,76 ± 0,18 ^{Aa}	9,13 ± 0,32 ^{Ba}
	7	9,90 ± 0,08 ^{Aa}	9,73 ± 0,29 ^{Aa}	9,12 ± 0,21 ^{Ba}
	14	9,87 ± 0,14 ^{Aa}	9,89 ± 0,08 ^{Aa}	8,98 ± 0,27 ^{Ba}
	21	9,81 ± 0,03 ^{Aa}	9,75 ± 0,08 ^{Aa}	9,33 ± 0,27 ^{Ba}
	28	9,49 ± 0,10 ^{ABb}	9,84 ± 0,31 ^{Aa}	9,21 ± 0,26 ^{Ba}

Valores em média ± desvio padrão. (n = 3 lotes para cada formulação).

^{A,B} Letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha, indicam diferenças significativas entre as formulações (p < 0,05).

^{a,b} Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna para cada micro-organismo, indicam diferenças significativas entre os dias (p < 0,05).

O queijo *petit-suisse* mostrou-se uma matriz adequada para veicular os micro-organismos probióticos estudados. Considerando-se a porção de queijo *petit-suisse* (50 g), populações de 10⁷ - 10⁸ UFC/g (7 a 8 log UFC/g) de produto resultam em uma ingestão diária de 10⁸-10⁹ UFC. Neste estudo, tanto *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 quanto *L. acidophilus* LA-5 mantiveram os valores recomendados pela

ANVISA (2008) de 8 a 9 log UFC na porção diária do produto, durante todo período de armazenamento.

A média da viabilidade dos micro-organismos, ao longo do período de armazenamento, foi de 8,17 e 8,37 log UFC/g para *L. acidophilus* LA-5, respectivamente, em QP e QS e para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 esta média foi de 8,64 log UFC/g em ambos os queijos. Para *S. thermophilus*, a média de viabilidade foi de 9,79, 9,80 e 9,15 log UFC/g em QP, QS e QC, respectivamente.

Durante o período de armazenamento (dia 1 até dia 28 de armazenamento), observou-se redução na população de micro-organismos probióticos. Entretanto, esta redução foi estatisticamente significativa para *L. acidophilus* LA-5, particularmente no caso de QP, onde se observou 2 quedas significativas ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento (após 14 e após 28 dias de armazenamento), chegando a uma redução de 1 ciclo log ao final do armazenamento (de 8,53 para 7,46 log UFC/g). Já para QS, essa queda da viabilidade foi de pouco mais que 0,50 log (de 8,61 para 7,99 log UFC/g), com uma diminuição significativa apenas na primeira semana de armazenamento. Embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, observou-se em QP uma redução superior a 1 ciclo log, ao final do período de armazenamento (de 8,94 para 7,69 log UFC/g) e de pouco mais que 0,50 log em QS (de 8,84 para 8,27 log UFC/g).

Entre as formulações, observou-se uma tendência a valores de viabilidade dos micro-organismos probióticos discretamente superiores em QS, comparada a QP. No entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Em relação à cultura *starter* de *S. thermophilus*, menores populações foram encontradas em QC ($p < 0,05$), embora a diferença entre as formulações tenha sido em média 0,60 log. Durante o período de armazenamento, ocorreu uma redução estatisticamente significativa, após 21º dia em QP.

CARDARELLI et al. (2008) e MARUYAMA et al. (2006) sugeriram o queijo *petit-suisse* como uma matriz propícia para veicular micro-organismos probióticos. CARDARELLI et al. (2008) observaram que a mistura de inulina e FOS proporcionou um efeito desejável ao atenuar a queda na viabilidade de *Bifidobacterium animalis*

subsp. *lactis* BL-04 e *Lactobacillus acidophilus* Lac-4 em queijo *petit-suisse* ao longo do período de armazenamento.

Do mesmo modo, AKALIN, FENDERYA e AKBULUT (2004), observaram que a adição de FOS em iogurte apresentou efeito positivo na viabilidade de *Bifidobacterium longum* e *B. animalis*, durante armazenamento refrigerado. De fato, no presente trabalho, observaram-se menores reduções na formulação acrescida de inulina e FOS, ao longo do período de armazenamento, embora não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos probióticos entre as formulações estudadas.

Apesar de serem substratos para fermentação de bactérias probióticas, acredita-se que a influência de inulina e FOS na viabilidade de micro-organismos probióticos pode não ser decorrente da fermentação por tais bactérias durante o período de armazenamento. Isto porque em baixas temperaturas ocorrem alterações no metabolismo bacteriano que limitam sua atividade fermentativa (BURITI et al., 2007b).

De acordo com DONKOR et al. (2007), quando o armazenamento é refrigerado, o efeito do prebiótico na viabilidade de micro-organismos probióticos se deve ao período prévio ao armazenamento, durante o processo de fermentação, em que os probióticos utilizam-se do substrato prebiótico. Assim como observado para *L. acidophilus* LA-5 no presente estudo, os mesmos autores observaram maior estabilidade, durante o armazenamento refrigerado, de populações dos probióticos *L. acidophilus* L-10 e *L. casei* L-26 em formulações de iogurte acrescidas de inulina.

Além de atuarem favoravelmente na viabilidade de micro-organismos probióticos, os prebióticos adicionados em queijos podem contribuir com efeitos positivos à saúde, como o aumento da biodisponibilidade de alguns minerais. Podem, ainda, representar uma vantagem competitiva para a cultura probiótica, uma vez que é possível uma interação e adaptação do probiótico ao substrato prebiótico (CRUZ et al., 2011).

Em relação à viabilidade da cultura *starter* de *S. thermophilus*, é possível que maiores populações de *S. thermophilus* nas formulações QP e QS estejam relacionadas à presença dos micro-organismos probióticos, uma vez que atividades de protocolo-operação podem ocorrer entre culturas *starter* e micro-organismos probióticos (VINDEROLA, MOCCHIUTTI & REINHEIMER, 2002).

Paralelamente à enumeração dos micro-organismos por métodos convencionais de semeadura em ágar seletivo, foi realizada a quantificação pela técnica independente de cultivo, qPCR. A proposta na comparação entre métodos de quantificação consistiu em um dos objetivos do presente trabalho. Os resultados obtidos pelos métodos de quantificação convencionais e de qPCR na viabilidade de *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *S. thermophilus*, encontram-se na Figura 4.

i.

ii.

iii.

Figura 4. Viabilidade de *L. acidophilus* LA-5 (i), *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (ii) e *S. thermophilus* (iii), quantificada pelos métodos de semeadura em ágar seletivo (■) e qPCR sem PMA (□) nas formulações de queijo *petit-suisse* estudadas, durante 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

QP: queijo *petit-suisse* probiótico; QS: queijo *petit-suisse* simbiótico; QC: queijo *petit-suisse* controle.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre método convencional e qPCR sem PMA, em cada formulação, para cada dia ($p < 0,05$).

Em relação aos ensaios realizados por qPCR para viabilidade, houve linearidade no intervalo de 10^8 ou $10^6 - 10^1$ das curvas padrão, representados por um R^2 entre 0,98 e 0,99 e a eficiência das reações esteve entre 90 e 110%, valores considerados aceitáveis (Anexo D). A análise das curvas de dissociação evidenciou especificidade da reação, uma vez que observou-se um único pico na curva (Anexo E).

Para a enumeração de *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, observou-se valores semelhantes, entre os resultados obtidos através do método convencional e de qPCR. Exceto para os dias 7 e 28 de armazenamento de QP, para *L. acidophilus* LA-5 e os dias 1 e 14 de QP e dia 7 de QS para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, os valores obtidos em ambos os métodos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Especialmente, para os dias em que se observaram diferenças estatísticas, nota-se uma tendência a valores superiores nos resultados obtidos pelo método de qPCR, exceto em QP dia 7 de *L. acidophilus* LA-5 em que os valores obtidos pelo método convencional foram superiores. A diferença variou entre 0,53 a $1,^{10}$ log entre os métodos e, em média, 0,70 log entre os métodos utilizados.

Para *S. thermophilus*, a diferença entre os valores obtidos através dos métodos convencionais e de qPCR foi significativa, particularmente nas formulações com probióticos, QP e QS. Nestas formulações, a média de população de *S. thermophilus* foi de 9,79 (QP) e 9,80 (QS) log células/g, obtidas pelo método convencional e 8,58 (QP) e 8,81 (QS) log células/g, obtidas pelo método de qPCR. Observou-se diferenças entre 0,43 a 1,88 log, com média 1,10 de células entre os valores obtidos através dos diferentes métodos, e os valores obtidos pelo método convencional foram mais elevados, comparados aos obtidos por qPCR ($p < 0,05$). Em contrapartida, na formulação QC, que continha somente *S. thermophilus*, a diferença média entre os métodos foi de 0,32 log, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores encontrados para esta formulação ($p > 0,05$).

As diferenças de quantificação entre os métodos, evidenciadas no presente estudo, principalmente para *S. thermophilus*, sugerem a possibilidade de que a presença de diferentes espécies, estreitamente relacionadas filogeneticamente e

com requerimentos de crescimento similares nos alimentos probióticos, tenham dificultado a identificação e a enumeração do micro-organismo alvo.

Embora o meio de cultura M17, adicionado de lactose seja amplamente utilizado e recomendado para quantificação seletiva de *S. thermophilus* (RICHTER & VEDAMUTHU, 2001; ASHRAF & SHAH, 2011), é possível que apresente capacidade seletiva comprometida frente a populações elevadas de *L. acidophilus* e *B. animalis*, visto que tanto *L. acidophilus* quanto *B. animalis*, apresentam capacidade de metabolizar lactose como fonte de carboidrato (SRINIVAS, MITAL & GARG, 1990; SHAH & LANKAPUTHRA, 2003).

Por outro lado, outros micro-organismos poderiam ter dificultado a contagem de *S. thermophilus*. É possível que o leite utilizado na produção dos queijos, embora pasteurizado, pudesse apresentar uma microbiota que possivelmente tenha se desenvolvido durante a produção do queijo *quark*. O processo de pasteurização visa à eliminação de patógenos, entretanto, não eliminam completamente a microbiota característica. Para elucidar, o estudo de ALBENZIO et al. (2001) identificou cepas de *Lactobacillus plantarum* em leite de ovelha pasteurizado.

Ressalta-se que o método de semeadura em ágar seletivo pode estar sujeito à contaminação ambiental acidental e, mesmo frente à distinção morfológica da espécie na placa, a subjetividade na identificação da colônia é inerente a este método e está intrinsecamente relacionada à acuidade e experiência individual.

Em relação à tendência de valores superiores encontrados através de qPCR, justifica-se, uma vez que técnicas moleculares como qPCR, apesar de elevada sensibilidade e precisão, não permitem distinguir células vivas e mortas, ou seja, o método determina a enumeração de todo DNA extraído da amostra, inclusive de células não viáveis.

MATIJASIC, OBERMAJER e ROGELJ (2010) compararam a viabilidade de micro-organismos probióticos em um produto liofilizado por método convencional e qPCR. Os autores observaram valores de viabilidade de *Bifidobacterium infantis*, obtidos por qPCR, em média 1,62 log superiores em relação ao método convencional.

Similarmente, MASCO et al. (2007), ao quantificarem *Bifidobacterium* em diferentes produtos probióticos por métodos moleculares, reforçaram que o método de qPCR pode superestimar o número de células intactas, metabolicamente ativas,

uma vez que o método baseia-se na quantificação indistinta de células vivas e mortas.

De modo a superar esta limitação do método, GARCÍA-CAYUELA et al. (2009) obteve sucesso ao avaliar a viabilidade de diferentes espécies de micro-organismos probióticos em leite fermentado, combinando a técnica de qPCR com o emprego de PMA, o qual restringe a quantificação às células viáveis.

A fim de garantir a propriedade funcional, é imprescindível a correta enumeração de bactérias probióticas viáveis em alimentos. De acordo com BOYER e COMBRISSE (2013), nos últimos 5 anos, diversos estudos tem sugerido a técnica de qPCR na detecção e quantificação de micro-organismos benéficos em produtos lácteos, visto a elevada especificidade e sensibilidade, além de menor tempo para obtenção dos resultados. No entanto, é essencial que mais estudos concentrem-se em aprimorar a técnica, com a padronização de métodos que permitam distinguir células vivas e mortas para uma adequada avaliação da viabilidade.

Adicionalmente, ressalta-se que, ao realizar uma análise comparativa entre métodos convencionais e moleculares, frequentemente se utiliza a região do gene 16S rRNA como alvo. Nesse sentido, é bem descrito que diversas bactérias apresentam múltiplas cópias deste gene, o que deve ser considerado ao transpor o número de cópias gerados na análise de qPCR para número de células equivalentes (MASCO et al., 2007).

5.6 Monitoramento dos micro-organismos indicadores de contaminação e pesquisa de patógenos

Na Tabela 11 e 12 encontram-se, respectivamente, as contagens de coliformes totais e leveduras, nas formulações QC, QP e QS durante o armazenamento refrigerado a 4 °C por até 28 dias. Na Tabela 13 estão apresentados os valores referentes à pesquisa de patógenos, ao 1º dia de armazenamento de cada formulação estudada. Não foi detectada presença de *E. coli* e de bolores entre as formulações e dias analisados.

Tabela 11. Valores referentes à contagem de coliformes totais, obtidos para as formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante armazenamento refrigerado a 4 °C por até 28 dias.

Período de armazenamento (dias)	Populações de coliformes totais nas formulações (log UFC/g)*		
	QC	QP	QS
1	< 1-1,54	< 1-2,48	< 1
7	< 1-1,39	< 1-2,77	< 1-1,35
14	< 1	< 1-1,94	< 1
21	< 1	< 1	< 1
28	< 1	< 1	< 1-1,24

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

Tabela 12. Valores referentes à contagem de leveduras, obtidos para as formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante armazenamento refrigerado a 4 °C por até 28 dias.

Período de armazenamento (dias)	Populações de leveduras nas formulações (log UFC/g)*		
	QC	QP	QS
1	< 1-3,5	< 1-2,86	< 1-1,79
7	< 1-3,70	< 1-4,10	1,62-2,98
14	< 1-4,32	< 1-4,97	2,02-4,17
21	< 1-5,07	2,15-5,06	2,72-5,15
28	< 1-5,07	1,92-4,87	3,14-5,68

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

Tabela 13. Pesquisa de patógenos nas formulações de queijo *petit-suisse* controle (QC), probiótico (QP) e simbiótico (QS), ao 1º dia de armazenamento.

Parâmetros microbiológicos	QC	QP	QS
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva (UFC/g)	< 100	< 100	< 100
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25 g)	ausente	ausente	ausente
<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)	ausente	ausente	ausente

Para alimentos, dispõe-se atualmente do “Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos”, aprovado pela ANVISA (2001). Especificamente para queijos *petit-suisse*, deve-se cumprir o “Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos, para queijos de muita alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundante”. O Regulamento vigente não estabelece limites de contagem de coliformes totais, bolores e leveduras. Para *Staphylococcus* coagulase-positiva, dispõe um limite máximo de 10^3 UFC/g de produto, enquanto que *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* devem estar ausentes.

Os lotes de queijos foram elaborados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (ANVISA, 2002), adotando-se medidas de higiene de utensílios, equipamentos, ingredientes e na manipulação, durante todo processo de fabricação. Os resultados obtidos do monitoramento de micro-organismos contaminantes e pesquisa de patógenos inferem que os queijos estão em conformidade com o Regulamento Técnico específico.

5.7 Sobrevivência dos probióticos incorporados nos queijos frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*

A sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 nos queijos *petit-suisse* QP e QS, frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* durante o período de armazenamento está ilustrada, respectivamente, nas Figuras 5 e 6, conforme resultados obtidos pelo método de semeadura em ágar seletivo.

Adicionalmente, para os resultados obtidos através de métodos tradicionais, foi calculada a taxa de sobrevivência (Tabelas 14 e 15) dos micro-organismos probióticos estudados nas formulações QP e QS, durante o período de armazenamento, de acordo com o item 3.8.3.

Figura 5. Sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) durante o armazenamento por 1, 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii, iv e v, respectivamente) antes (■) e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástrica após 2 horas (□) e entérica após 4 horas (▨) e 6 horas (▩) de ensaio.

^{A,B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as fases, para cada formulação.

Figura 6. Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) durante o armazenamento por 1, 7, 14, 21 e 28 dias (i, ii, iii, iv e v, respectivamente) antes (■) e durante o ensaio *in vitro* com simulação das condições gástrica após 2 horas (▒) e entérica após 4 horas (□) e 6 horas (▨) de ensaio .

^{A, B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as fases, para cada formulação.

Tabela 14. Taxa de sobrevivência (%) de *L. acidophilus* LA-5 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, nas formulações de queijo *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante período de armazenamento a 4 °C, de acordo com valores obtidos no método convencional de semeadura em ágar seletivo.

Período de armazenamento (dias)	Queijo <i>petit-suisse</i>	
	QP	QS
1	61,60 ± 3,29 ^{Aa}	49,07 ± 0,81 ^{Ba}
7	43,15 ± 2,74 ^{Ab}	45,90 ± 3,20 ^{Aa}
14	42,12 ± 3,60 ^{Ab}	32,22 ± 2,80 ^{Bc}
21	40,18 ± 5,32 ^{Ab}	42,34 ± 1,71 ^{Aab}
28	39,24 ± 2,87 ^{Ab}	36,77 ± 5,06 ^{Ac}

Valores em média ± desvio padrão

^{A, B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações, para cada período de armazenamento. ^{a, b} Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os dias de armazenamento, para cada formulação.

Tabela 15. Taxa de sobrevivência (%) de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, nas formulações de queijo *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS), durante período de armazenamento a 4 °C, de acordo com valores obtidos no método convencional de semeadura em ágar seletivo.

Período de armazenamento (dias)	Queijo <i>petit-suisse</i>	
	QP	QS
1	80,02 ± 3,17 ^{Ba}	88,01 ± 2,67 ^{Aa}
7	76,28 ± 0,58 ^{Bab}	85,21 ± 2,32 ^{Aa}
14	72,29 ± 1,61 ^{Bab}	80,17 ± 0,89 ^{Aab}
21	69,89 ± 4,42 ^{Ab}	70,44 ± 4,84 ^{Ab}
28	59,77 ± 2,81 ^{Ac}	59,57 ± 5,42 ^{Ac}

Valores em média ± desvio padrão

^{A, B} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações, para período de armazenamento. ^{a, b} Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os dias de armazenamento, para cada formulação.

De acordo com os resultados obtidos através dos métodos convencionais de quantificação, obteve-se população inicial média de 8,41 log UFC/g para *L. acidophilus* LA-5 e 8,98 log UFC/g para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, considerando todo período de armazenamento e formulações estudadas.

Ao final do ensaio (6h), observou-se uma sobrevivência média de 47,63% e 39,35% na população de *L. acidophilus* LA-5 em QP e QS, respectivamente, enquanto que a sobrevivência média de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi de 70,69% e 75,94%, em QP e QS, respectivamente.

Em relação às fases do ensaio de sobrevivência, reduções significativas ($p < 0,05$) sucederam-se na fase gástrica (2h) e entérica I (4h), embora a fase gástrica tenha representado uma barreira mais significativa para *L. acidophilus* LA-5 do que para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Na fase gástrica, a redução média na população de *L. acidophilus* LA-5 foi 3,69 log UFC/g em QP e 3,71 log UFC/g em QS, enquanto que para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 a redução média foi de 1,44 log UFC/g em QP e 0,39 log UFC/g em QS.

Já na fase entérica I, foram observadas reduções médias de 1,26 log UFC/g em QP e 1,09 log UFC/g em QS, para *L. acidophilus* LA-5 e 1,30 log UFC/g em QP e 1,50 log UFC/g em QS, para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Adicionalmente, ao final do período de armazenamento (28 dias), foram observadas menores taxas de sobrevivência dos micro-organismos probióticos ($p < 0,05$), representadas por reduções médias de 17,30 e 24,30 pontos percentuais (pp), para *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis*, respectivamente, comparadas ao 1º dia de armazenamento. É possível que as cepas tenham se tornado mais susceptíveis ao efeito das enzimas digestivas com o aumento do tempo de prateleira.

Corroborando com os achados de SAARELA et al. (2006), a estabilidade na viabilidade, observada para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, no presente estudo, durante o período de armazenamento, não foi evidenciada ao avaliar a sobrevivência do mesmo micro-organismo frente às condições gástricas e entéricas simuladas. Como elucidado pelos mesmos autores, a avaliação isoladamente da viabilidade não é suficiente para prever a funcionalidade do probiótico.

Assim como observado no presente estudo, WANG et al. (2009) ilustrou a influência do período de armazenamento na taxa de sobrevivência frente às condições gástricas e entéricas simuladas. O estudo observou redução da taxa de sobrevivência de *L. casei* Zhang em leite bovino, especialmente após 14 dias de armazenamento refrigerado.

CHAMPAGNE e GARDNER (2008) ao avaliarem a influência do período de armazenamento na sobrevivência de *Lactobacillus* em suco de fruta, observaram que a sobrevivência à etapa gástrica foi a mais prejudicada pelo período de armazenamento, similarmente aos achados do presente estudo.

A fase gástrica consiste em uma primeira barreira a ser superada por micro-organismos probióticos, pois representa um mecanismo de defesa humano contra possíveis patógenos. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, a capacidade de superar o baixo pH e as enzimas do suco gástrico tem sido mais associada a lactobacilos do que bifidobactérias (DUNNE et al., 2001; LO CURTO et al., 2011).

Estudos de sobrevivência de micro-organismos probióticos *in vitro* são controversos. Assim como observado no presente estudo, alguns autores relataram que a etapa gástrica foi decisiva na sobrevivência de *L. acidophilus*, enquanto que para *B. animalis* esta etapa não representou a mesma influência (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010; MADUREIRA et al., 2011). Entretanto, outros estudos indicaram uma boa resistência de *L. acidophilus*, inclusive na etapa gástrica e sugeriram que a resistência de bifidobactérias é cepa-específica (MADUREIRA et al., 2005; LO CURTO et al., 2011).

É possível que a resistência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ao ensaio de sobrevivência neste estudo se deva à capacidade de adaptação de algumas cepas de *Bifidobacterium* spp. diante do estresse ao pH ácido (SANZ, 2007). Algumas cepas quando expostas ao suco gástrico, composto por pepsina e ácido, apresentam maior sobrevivência do que se a exposição fosse somente a um pH reduzido. Tem-se sugerido um possível efeito protetor da pepsina para algumas dessas células bacterianas (MATSUMOTO, OHISHI & BENNO, 2004; MADUREIRA et al., 2011).

Nas fases entéricas, a resistência do micro-organismo está associada à sua capacidade em resistir aos ácidos e sais biliares. Isto porque a bile pode afetar a

estrutura e estabilidade celular de bactérias (BEGLEY, GAHAN & HILL, 2005). Entretanto, identificou-se a presença de hidrolases de sais biliares em alguns gêneros bacterianos, dentre eles *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Essas hidrolases de sais biliares podem favorecer a resistência das bactérias frente aos sais biliares pela capacidade de hidrolisar esses sais (BEGLEY, HILL E GAHAN, 2006).

Embora não se tenha estabelecido consenso ou recomendação acerca da quantidade de micro-organismos probióticos viáveis que devem alcançar o final do TGI, acredita-se que esta quantidade esteja relacionada ao efeito benéfico à saúde. GHADIMI et al. (2008) elucidaram o efeito dose-resposta em um estudo *in vitro*, com cultura de células, realizado para averiguar a influência dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* na imunomodulação. Os autores observaram possíveis efeitos benéficos com 2×10^7 UFC/ml. Entretanto, os efeitos não foram relacionados necessariamente às células viáveis, uma vez que também foram observados quando da aplicação de 75 µg/ml de DNA das cepas.

Entre as formulações estudadas, pôde-se observar proteção significativa, conferida pela presença de prebióticos (QS) na sobrevivência de *B. animalis* subsp *lactis* até o 14º dia de armazenamento ($p < 0,05$) (Tabela 15). Adicionalmente, o efeito protetor atribuído ao prebiótico parece estar relacionado principalmente à fase gástrica, observado principalmente ao 7º e 21º dia de armazenamento (Figura 6).

Em contrapartida, os mesmos efeitos associados ao componente prebiótico não foram confirmados para *L. acidophilus* LA-5. Para este micro-organismo, a taxa de sobrevivência foi similar entre as formulações ou significativamente menor ($p < 0,05$) na formulação acrescida de prebióticos, nos dias 1 e 14 de armazenamento (Tabela 14).

A possível proteção do componente prebiótico pode estar relacionada à resistência de inulina e FOS às enzimas digestivas. Particularmente a inulina, por seu elevado grau de polimerização, apresenta menor solubilidade e capacidade de formar gel no produto. O gel formado consiste em uma possível proteção física, envolvendo a célula bacteriana ao longo do TGI (BURITI, CASTRO & SAAD, 2010), o que poderia ter favorecido a sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 no presente estudo.

Embora, no presente estudo a adição da mistura prebiótica não tenha apresentado efeito protetor na sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5, BURITI et al. (2010) observaram que a adição de inulina em musse de goiaba proporcionou maior tolerância deste micro-organismo, durante ensaio de sobrevivência, na primeira semana de armazenamento refrigerado.

Em contrapartida, o estudo de BEDANI, ROSSI e SAAD (2013) não revelou efeitos significativos da adição de inulina em iogurte de soja na sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5, frente às condições gástricas e entéricas similares ao presente estudo.

No presente trabalho, ao final do ensaio, na fase entérica II (6h), quando ocorre uma elevação no pH (~ 6,5), uma tendência à recuperação foi observada no dia 7 para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e nos dias 1 e 14 para *L. acidophilus* LA-5 na formulação QP, a qual pode ser atribuída à capacidade de reparo celular de lesões nas fases prévias, conforme sugerido por LISERRE, RÉ e FRANCO (2007) e por BURITI, CASTRO e SAAD (2010).

De fato, segundo KIMOTO-NIRA et al. (2010), na fase entérica os efeitos tóxicos da bile aos micro-organismos podem ser parcialmente abrandados se forem adicionados carboidratos metabolizáveis por estes micro-organismos, durante a fermentação em meio de cultura. Adicionalmente, PERRIN, GRILL e SCHNEIDER (2000), observaram que esse fator de influência pôde ser observado em cepas de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium animalis*, quando foi adicionado FOS.

Condições de estresse, como o pH ácido, podem dificultar a formação de colônias de células bacterianas. Essas células podem estar viáveis e apresentar atividades metabólicas. Contudo, podem não ser cultiváveis e, portanto, ter a sua detecção dificultada pelos métodos convencionais de contagem (GIRAFFA & CARMINATI, 2008).

Visto à necessidade de propor novas metodologias de quantificação de micro-organismos, mais sensíveis e de elevada especificidade, propôs-se, no presente trabalho, avaliar a utilização de métodos baseados em técnicas moleculares, promissores em superar as falhas relacionadas aos métodos convencionais utilizados.

A princípio, a proposta do presente estudo foi realizar um comparativo da sobrevivência dos micro-organismos probióticos *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em queijo *petit-suisse*, frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, através da perspectiva dos métodos tradicionalmente utilizados, baseados em semeadura em ágar seletivo e do método de qPCR, baseado em técnicas moleculares de quantificação.

Entretanto, particularmente em ensaios de sobrevivência frente às condições simuladas do TGI, são esperadas reduções nas populações dos probióticos estudados. Neste sentido, o método de qPCR, isoladamente, não atende a proposta de avaliar a viabilidade celular, uma vez que não possui a capacidade de distinguir células vivas e mortas na quantificação. Portanto, foi inserido na proposta deste estudo um método adicional para a quantificação, com a adição de PMA, que permite a diferenciação de células vivas e mortas ao intercalar-se no DNA de células cuja membrana esteja comprometida e, assim, omitir as células mortas da amplificação na PCR.

As Figuras 7 e 8 compõe um cenário comparativo entre os resultados obtidos através dos métodos convencional e moleculares de qPCR com e sem o reagente PMA, nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento, para *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, respectivamente.

Em relação aos ensaios realizados por qPCR para o ensaio de sobrevivência *in vitro*, houve linearidade no intervalo de 10^8 ou $10^6 - 10^1$ das curvas padrão, representados por um R^2 entre 0,98 e 0,99 e a eficiência das reações esteve entre 90 e 110%, valores considerados aceitáveis (Anexo D). A análise das curvas de dissociação evidenciou especificidade da reação, uma vez que observou-se um único pico na curva (Anexo E).

i.

ii.

iii.

Figura 7. Sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) frente às condições gástricas e entéricas simulada *in vitro*, durante o armazenamento por 1 (i) , 14 (ii) e 28 (iii) dias, através dos métodos convencional (■) qPCR sem PMA (▒) e qPCR com PMA (□).

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre os métodos de quantificação, para cada fase.

i.

ii.

iii.

Figura 8. Sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) frente às condições gástricas e entéricas simulada *in vitro*, durante o armazenamento por 1 (i) , 14 (ii) e 28 (iii) dias, através dos métodos convencional (■), qPCR sem PMA (▒) e qPCR com PMA (□).

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre os métodos de quantificação, para cada fase.

O início do ensaio de sobrevivência *in vitro* consiste na etapa prévia às fases simuladas do TGI. Portanto, assim como observado na análise de viabilidade das formulações de queijo *petit-suisse*, o método qPCR sem PMA apresentou valores semelhantes ou superiores aos valores obtidos pelo método convencional para *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Como esperado, já que o método detecta o DNA total presente, não foram observadas variações relevantes nos valores obtidos para o método de qPCR sem PMA, entre as fases do ensaio *in vitro*. As diferenças entre os valores encontrados através do método de qPCR entre as fases do ensaio foram em média, 0,66 log para *L. acidophilus* LA-5 e 0,82 log para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

Em relação ao método de qPCR com PMA, os valores obtidos apresentaram-se inferiores aos obtidos pelo método de qPCR sem PMA, o que sugere que o método foi eficiente em omitir células mortas na quantificação.

Especialmente para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, os valores obtidos pelo método de qPCR com PMA, em geral, apresentaram-se semelhantes aos obtidos pelo método convencional. Embora algumas diferenças estatísticas tenham sido observadas, a diferença entre os valores foram, em média, inferiores a 0,50 log e observou-se um coeficiente de correlação linear de Pearson $r = 0,92$ entre os métodos.

Para *L. acidophilus* LA-5, na etapa inicial do ensaio, os valores obtidos pelo método qPCR com PMA apresentaram-se menores, exceto ao 28º dia de armazenamento, comparados ao método convencional ($p < 0,05$). Por outro lado, a partir da fase gástrica, os valores apresentaram-se, em geral, similares ou superiores em qPCR com PMA.

Até o momento, não foi detectado nenhum estudo que avaliou comparativamente métodos convencionais e moleculares de qPCR com e sem tratamento de PMA, na quantificação de micro-organismos em estudos de sobrevivência *in vitro* frente às condições simuladas do TGI.

GARCÍA-CAYUELA et al. (2009) avaliaram a viabilidade de cepas probióticas, incluindo *L. acidophilus* LA-5 e *B. lactis* BB-12, em leite fermentado comercial durante e após expirado o período de armazenamento, através de métodos de semeadura em ágar seletivo e de qPCR com tratamento de PMA. Foram observados valores similares obtidos entre os métodos, além de um coeficiente de correlação

linear de Pearson $r = 0,995$, mesmo após expirado o prazo de validade, em que se observaram reduções nas populações dos micro-organismos.

Similarmente, KAUSHIK e BALASUBRAMANIAN (2013) utilizaram métodos convencionais e de qPCR com e sem tratamento de PMA para quantificar patógenos Gram-negativos em partículas de ar e observaram $r = 1,00$ entre qPCR com PMA e métodos convencionais.

DE WIELE et al. (2004), em um estudo *in vitro* sobre o efeito da administração de inulina em compartimentos que mimetizam o cólon intestinal humano, observaram que o método de qPCR foi mais sensível em identificar modificações na população de bifidobactérias do que métodos tradicionais de cultivo.

Estudos *in vivo* avaliaram a recuperação de cepas probióticas em fezes, após intervenção com produto adicionado de probiótico, utilizando-se a técnica de qPCR (SAXELIN et al., 2010; SAVARD et al., 2011). Entretanto, nestes estudos, a discussão acerca da sobrevivência dos micro-organismos probióticos logo após a intervenção deve ser apresentada com cautela, diante da não distinção de células vivas e mortas pelo método de qPCR utilizado isoladamente.

Diversos estudos observaram que o tratamento com PMA foi eficiente em omitir células mortas (NOCKER, CHEUNG & CAMPER, 2006; KOBAYASHI et al., 2009; NOCKER et al., 2009). Entretanto, KOBAYASHI et al. (2009) observou uma discreta interferência do tratamento na detecção de células viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, subestimando-as em aproximadamente 0,5 log.

Igualmente, no estudo de NOCKER, CHEUNG e CAMPER (2006) foi observado que, em uma concentração de 240 μM de PMA e tempo de foto-ativação de 15 minutos, o método subestimou a detecção de células viáveis de *Escherichia coli*, mas não a detecção de *Streptococcus sobrinus*.

Em contrapartida, alguns autores sugeriram que o tratamento com PMA pode superestimar a quantidade de células vivas, principalmente diante de elevadas concentrações celulares (LEE & LEVIN, 2009; LØVDAL et al., 2011). Embora o PMA penetre na célula morta, elevadas concentrações celulares poderiam inibir a ligação covalente com o DNA no processo de foto-ativação.

No presente estudo, sugere-se que as condições do ensaio de qPCR com PMA para quantificação de *L. acidophilus* LA-5 na fase inicial requerem otimização,

visto os valores muito inferiores, comparados ao método convencional e de qPCR sem PMA.

O PMA, por ser uma molécula desenvolvida recentemente, métodos de validação e otimização são necessários para a sua aplicação (LØVDAL et al., 2011). NOCKER et al. (2009) ressaltaram que a eficiência do PMA em omitir células mortas pode variar entre micro-organismos e matrizes utilizadas. Os autores acrescentam que os ensaios devem ser otimizados, o que inclui, principalmente, tempo de exposição ao escuro e à luz e concentração de PMA, de acordo com a microbiota a ser quantificada.

Em relação aos valores de qPCR com PMA para *L. acidophilus* LA-5, nas fases gástricas e entéricas apresentarem-se superiores em relação aos métodos convencionais, é possível que a susceptibilidade ao período de armazenamento, sobreposta ao estresse frente às condições gástricas e entéricas simuladas tenham dificultado a formação de colônias e, portanto, a detecção e quantificação por métodos tradicionais. Portanto, é possível que o método de qPCR com PMA tenha apresentado maior sensibilidade na detecção de DNA de células viáveis, porém não cultiváveis e que o método convencional utilizado para *L. acidophilus* LA-5 tenha subestimado o número de células viáveis.

Métodos tradicionais, apesar de serem mais simples, apresentam menor especificidade, demandam mais tempo para obtenção de resultados (48 a 72 horas através de métodos tradicionais e 6 horas através de qPCR) e são menos sensíveis às células viáveis, porém não cultiváveis.

Em ensaios de sobrevivência de micro-organismos frente às condições de estresse, os principais interesses da utilização de técnicas moleculares consistem em identificar células viáveis, porém não cultiváveis devido à elevada sensibilidade e especificidade. Particularmente quando se deseja estimar a população de células vivas, a utilização de agentes capazes de omitir células mortas na quantificação torna-se essencial.

6. PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS

- O queijo *petit-suisse* mostrou-se uma matriz potencial para os micro-organismos probióticos *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. A viabilidade dos probióticos alcançou valores desejáveis, superiores a 7 log UFC/g nas formulações QP (probiótico) e QS (simbiótico), até o 28º dia de armazenamento do produto a 4°C, portanto acima de 8 log UFC, considerando-se uma porção diária de 50 g e de acordo com a legislação vigente no país. Embora tenha sido observada uma tendência a valores de viabilidade dos micro-organismos probióticos discretamente superiores em QS, comparada a QP, não houve influência significativa da mistura prebiótica na viabilidade desses micro-organismos. Entretanto, durante o período de armazenamento (dia 1 até dia 28 de armazenamento), observou-se uma tendência a menores quedas nas formulações com a mistura prebiótica. Particularmente para *L. acidophilus* LA-5, observou-se apenas uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na primeira semana de armazenamento em QS, enquanto que em QP se observou 2 quedas significativas ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento.
- Frente às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, observou-se uma taxa de sobrevivência de, em média, 47,63% e 39,35% para *L. acidophilus* LA-5 em QP e QS, respectivamente, e de 70,69% e 75,94% para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, em QP e QS, respectivamente. Adicionalmente, menores taxas de sobrevivência foram observadas ao final do período de armazenamento, com reduções médias de 17,30 e 24,30 pp, para *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, respectivamente, comparadas ao 1º dia de armazenamento.
- Foi observado um efeito protetor do componente prebiótico sobre *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 no ensaio *in vitro*, até o 14º dia de armazenamento refrigerado. Em contrapartida, para *L. acidophilus* LA-5, observou-se maior sobrevivência nos queijos sem a mistura prebiótica, nos dias 1 e 14 de armazenamento. Adicionalmente, o período de armazenamento influenciou na resistência dos probióticos durante o ensaio de sobrevivência.
- A adição de micro-organismos probióticos no queijo *petit-suisse* proporcionou influência significativa nos parâmetros de textura, os quais provavelmente contribuíram para maiores escores de aceitabilidade nas formulações com

probióticos. A adição de probióticos no queijo *petit-suisse* resultou em influência significativa nos parâmetros de textura, os quais provavelmente contribuíram para maiores escores de aceitabilidade, nas formulações com probióticos (escore > 5,9), em relação ao produto controle (escore < 5,3). Adicionalmente houve influência positiva da mistura prebiótica na aceitabilidade (escore = 6,8) da formulação simbiótica, aos 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

- Entre os métodos utilizados na avaliação da viabilidade dos micro-organismos, os valores obtidos através dos métodos convencional e qPCR foram, em geral, semelhantes. Porém, observou-se uma tendência a superestimar a população dos micro-organismos, no método de qPCR. No ensaio de sobrevivência *in vitro*, o método de qPCR com PMA mostrou-se adequado em omitir as células não viáveis e apresentou valores similares aos obtidos através do método convencional para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. Particularmente para *L. acidophilus* LA-5, qPCR com PMA representou uma alternativa promissora, principalmente em relação à quantificação de células viáveis, porém não cultiváveis. Entretanto, a quantificação de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 em queijo *petit-suisse* por qPCR com PMA requer mais estudos, em vista a otimizar o ensaio para a quantificação destes micro-organismos em co-cultura no produto estudado.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem os queijos *petit-suisse* probiótico (QP) e simbiótico (QS) como matrizes potencialmente funcionais, uma vez que apresentaram populações de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 superiores a 7 log UFC/g de produto. A formulação QS apresentou maior vantagem em termos de estabilidade da população de *L. acidophilus* LA-5, ao longo da vida de prateleira do produto e na sobrevivência *in vitro* de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ($p < 0,05$), com taxas de sobrevivência médias, nos dias 1 e 28, respectivamente, de 59,6 e 88,0%, em QS e 59,7 e 80,0%, em QP. Embora a adição da mistura prebiótica não tenha apresentado efeito favorável na sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5, QS ainda seria a melhor opção, por apresentar característica prebiótica e maior aceitabilidade sensorial, aos 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$), com escore de aceitação de 6,8 neste período.

Em relação aos métodos de quantificação dos micro-organismos probióticos, a utilização de técnicas moleculares apresentaram-se mais adequadas, especialmente qPCR com PMA mostrou-se extremamente útil em omitir células mortas e em identificar células viáveis, porém não cultiváveis, superando limitações dos métodos convencionais e de qPCR. Entretanto, a quantificação simultânea de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 na matriz do queijo *petit-suisse* requer mais estudos, em vista a otimizar as condições do ensaio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 13 out. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa n.53, de 29 de dezembro de 2000.** Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo "Petit-Suisse". Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1605>. Acesso em: 26 mar. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n.18, de 30 de abril de 1999a.** Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde no rótulo. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 13 out. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n.19, de 30 de abril de 1999b.** Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde no rótulo. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 13 out. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001.** A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 22 set. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.275, de 21 de outubro de 2002.** Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/DCF7A900474576FA84CFD43FBC4C6735/RDC+N%C2%BA+275,+DE+21+DE+OUTUBRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 06 mar. 2013.

¹ De acordo com a NBR6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003.** A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto n.3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o art. 111, inciso I, alínea “b”, § 1º do regimento interno aprovado pela Portaria n.593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 17 de dezembro de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm. Acesso em: 12 mar. 2012.

AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.613–621, 2004.

ALBENZIO, M.; CORBO, M.R.; REHMAN, S.U.; FOX, P.F.; DeANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.35–48, 2001.

ALLGEYER, L.C.; MILLER, M.J.; LEE, S.Y. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.10, p.4471–4479, 2010.

AO, X.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; SHI, L.; ZHAO, K.; YU, J.; DONG, L.; CAO, Y.; CAI, Y. Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1073-1084, 2012.

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. Studies on functional foods in Japan-state of the art. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.60, n.1, p.9-15, 1996.

ARVANITOYANNIS, I.S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, M. 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.

ASHRAF, R.; SHAH, N.P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, n.3, p.194–208, 2011.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.382-389, 2013.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.625–651, 2005.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.1729–1738, 2006.

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, 2011. cap.2, p.51-84.

BERGAMINI, C.V.; HYNES, E.R.; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V.B.; ZALAZAR, C.A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v.38, n.5, p.597-604, 2005.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.1, p.8-15, 1996.

BOYER, M.; COMBRISSE, J. Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. **International Dairy Journal**, v.30, p.45-52, 2013.

BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p.375-387, 2004.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1605-1610, 2007b.

BURITI, F.C.A.; 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, p.228-235, 2007.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.121–129, 2010.

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, p.179-185, 2007a.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173–180, 2005.

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, 2005.

BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Cheese as probiotic carrier: technological aspects and benefits. In: HUI, Y.H.; EVRANUZ, E.Ö., eds. **Handbook of animal-based fermented food and beverage technology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. v.1, cap.44, p.749-784.

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, 2008.

CARDARELLI, H.R.; FEBBO, C.; SAAD, S.M.I. Monitoramento de parâmetros de textura instrumental em queijo *petit-suisse* probiótico ao longo de sua vida de prateleira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p.147-149, 2003.

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.

CASTRO, W.F.; CRUZ, A.G.; BISINOTTO, M.S.; GUERREIRO, L.M.R.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A.; CUNHA, R.L.; DELIZA, R. Development of probiotic dairy beverages: rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.16–25, 2013.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v.41, p.539–543, 2008.

CLYDESDALE, F.M. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for health claims for functional foods. **Nutrition Reviews**, v.55, p.413-422, 1997.

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. Dairy products. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D., eds. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, 2008. p.31-90. (Food microbiology and food safety series).

CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1560–1568, 2008.

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, n.8, 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, 2011. cap.13, p.305-338.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of selective media for enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1529-1536, 1996.

DE WIELE, T.V.; BOON, N.; POSSEMIERS, S. JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v.51, p.143-153, 2004.

DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, p.657-665, 2007.

DOTTERUD, C.K.; STORRØ, R.J.; ØIEN, T. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. **British Journal of Dermatology**, v.163, n.3, p.616-623, 2010.

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

DUGGAN, J.G.; GANNON, J.; WALKER, W.A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, n.5, p.789-808, 2002.

DUNNE, C.; O' MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O' HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, suppl., p.386S-392S, 2001.

EJTAHED, H.S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v.28, p.539-543, 2012.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICĂ, M.; KURI, V.; BRENNAN, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.2, p.89-93, 2002.

ESPÍRITO-SANTO, A.P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Influence of food matrices on probiotic viability: a review focusing on the fruity bases. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, n.7, p.377-385, 2011.

EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v.81, suppl.1, p.S1-S27, 1999.

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**: 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, American Córdoba Park Hotel, Argentina, 1-4 October 2001. Rome: FAO/WHO, 2001. 34p.

FORTIN, M.H.; CHAMPAGNE, C.P.; ST-GELAIS, D.; BRITTEN, M.; FUSTIER, P.; LACROIX, M. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. **International Dairy Journal**, v.21, p.75-82, 2011.

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

FRANCK, A. Food applications of prebiotics. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p.437–448.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.S287-S291, 2002.

GARCÍA-CAYUELA, T.; TABASCO, R.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v.19, p.405-409, 2009.

GARCÍA-CAYUELA, T.; TABASCO, R.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v.19, p.405-409, 2009.

GHADIMI, D.; FÖLSTER-HOLST, R.; DE VRESE, M.; WINKLER, P.; HELLER, K.J.; SCHREZENMEIR, J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH 1/TH 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. **Immunobiology**, v.213, p.677–692, 2008.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; SCOTT, K.P.; RASTALL, R.A.; TUOHY, K.M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E.F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; MACFARLANE, S.; DELZENNE, N.; RINGEL, Y.; KOZIANOWSKI, G.; DICKMANN, R.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; QALKER, C.; BUDDINGTON, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v.7, n.1, p.1–19, 2010.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D., eds. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, 2008. cap.1, p.1-30. (Food microbiology and food safety series).

GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. **Journal of Food Engineering**, v.111, p.299–304, 2012.

GOMES, A.A.; BRAGA, S.P.; CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; LOLLO, P.C.B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.10, p.4777-4786, 2011.

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.

GONZÁLEZ-TOMÁS, L.; BAYARRI, S.; COSTELL, E. Inulin-enriched dairy desserts: physicochemical and sensory aspects. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4188–4199, 2009.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.1640–1646, 2009.

HARMSSEN, H.J.M.; WILDEBOER-VELOO, A.C.; RAANGS, G.C.; WAGENDORP, A.A.; KLIJN, L.; BINDELS, J.G.; WELLING, G.W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.30, p.61–67, 2000.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&or derby=1&Itemid=7. Acesso em: 19 mar. 2009.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.306, p.23-33, 1995.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v.25, p.745-761, 2008.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT – Food Science and Technology**, v.39, p.1221-1227, 2006.

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, n.1, p.80–88, 2000.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; CRUZ, A.G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science & Technology**, v.91, n.3, p.283-308, 2011.

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Discrimination of viable from non-viable Gram-negative bacterial pathogens in airborne particles using propidium monoazide-assisted qPCR. **Science of the Total Environment**, v.449, p.237–243, 2013.

KHAN, R.S.; GRIGOR, J.; WINGER, R.; WIN, A. Functional food product development: opportunities and challenges for food manufacturers. **Trends in Food Science & Technology**, v.30, n.1, p.27-37, 2012. [Review].

KIMOTO-NIRA, H.; SUZUKI, C.; SASAKI, K.; KOBAYASHI, M.; MIZUMACHI, K. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under *in vitro* conditions simulated gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.226–229, 2010.

KLAPPENBACH, J.A.; SAXMAN, P.R.; COLE, J.R.; SCHMIDT, T.M. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n.1, p. 181-184, 2001.

KOBAYASHI, H.; OETHINGER, M.; TUOHY, M.J.; HALL, G.S.; BAUER, T.W. Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, n.9, p.1243-1247, 2009.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.373-393, 2011.

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.

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.

LAVANDA, I.; SAAD, S.M.I.; LOBO, A.R.; COLLI, C. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del cálcio. **Revista de Nutrição**, v.24, n.2, p.333-344, 2011.

LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC, 1999. 322p.

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

LEE, J.L.; LEVIN, R.E. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.93–96, 2009.

LIM, B.T.; DeMAN, J.M.; DeMAN, L.; BUZZELL, R.I. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: calcium sulfate coagulant. **Journal of Food Science**, v.55, n.4, p.1088-1900, 1990.

LISERRE, A.M.; RÉ, M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, p.1-16, 2007.

LO CURTO, A.; PITINO, I.; MANDALARI, G.; DAINY, J.R.; FAULKS, R.M.; WICKHAM, M.S.J. Survival of probiotic *lactobacilli* in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v.28, p.1359-1366, 2011.

LØVDAL, T.; HOVDA, M.B.; BJÖRKBLOM, B. MØLLER, S.G. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. **Journal of Microbiological Methods**, v.85, p.164–169, 2011.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, p.465–470, 2011.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v.15, p.921–927, 2005.

MARAFON, A.P.; SUMI, A.; ALCÂNTARA, M.R.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, n.2, p.511-519, 2011.

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, p.386–393, 2006.

MASCO, L.; VANHOUTTE, T.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.351-357, 2007.

MATIAS, N.S. **Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta**. São Paulo, 2011. 78p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MATIJASIC, B.B.; OBERMAJER, T.; ROGELJ, I. Quantificação de *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. **Food Control**, v.21, p.419-425, 2010.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.109-113, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MCFARLAND, L.V. Probiotics and diarrhea. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.57, n.1, p.10-11, 2010.

MCGILL, A.E.J. The potential effects of demands for natural and safe foods on global food security. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.402-406, 2009.

MERENSTEIN, D.; MURPHY, M.; FOKAR, A.; HERNANDEZ, R.K.; PARK, H.; NSOULI, H.; SANDERS, M.E.; DAVIS, B.A.; NIBORSKI, V.; TONDU, F.; SHARA, N.M. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study: a patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo controlled, clinical trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.7, p.669-677, 2010.

METCHNIKOFF, E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: MITCHELL, P.C.; METCHNIKOFF, E., eds. **The prolongation of life: optimistic studies**. London: William Heinemann, 1907. p.161-183.

MIKKELSON, B.J.; LEE, C.M.; PONCE, A. Optimization of PMA-PCR protocol for viability detection of pathogens. **NASA USRP – Internship Final Report**, p.1-8, Summer 2011. Disponível em: <http://usrp.usra.edu/technicalPapers/jpl/MikkelsonSep11.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2013.

MOHAMMADI, R.; KHOSROKHAVAR, R.; CRUZ, A.G. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v.61, p.411-424, 2011.

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J.; MUELLER, M.; RADKE, M.; BLAUT, M. Effects of *Bifidobacterium lactis* supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin and IgA in preterm infants. **Pediatric Research**, v.64, p.418-422, 2008.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, n.2, p.310-320, 2006.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective

removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, n.2, p.310-320, 2006.

NOCKER, A.; MAZZA, A.; MASSON, L.; CAMPER, A.K.; BROUSSEAU, R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.253–261, 2009.

O'SULLIVAN, D.J. Primary sources of probiotic cultures. In: GOKTEPE, I.; JUNEJA, V.K.; AHMEDNA, M., eds. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.91-107.

OUWEHAND, A.; LEYER, G.; CARCANO, D. Probiotics reduce incidence and duration of respiratory tract infection symptoms in 3- to 5-year-old children. **Pediatrics**, v.121, suppl.S, p.S115, 2008.

PARVEZ, K.A.; MALIK, S.; KANG, S.A.H.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Bacteriology**, v.100, p.1171-1185, 2006.

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.

PERRIN, S.; GRILL, J.P.; SCHNEIDER, F. Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.968–974, 2000.

POWELL, I.B.; BROOME, M.C.; LIMSOWTIN. Starter cultures: general aspects. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F., eds. **Encyclopedia of dairy sciences**. Amsterdam: Academic Press, 2003. v.1, p.261-268.

RAJAGOPAL, S.N.; SANDINE, W.E. Associative Growth and Proteolysis of *Streptococcus thermophiles* and *Lactobacillus bulgaricus* in Skim Milk. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.4, p.894-899, 1990.

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

RERKSUPPAPHOL, S.; RERKSUPPAPHOL, L. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* stored at ambient temperature are effective in the treatment of acute diarrhea. **Annals of Tropical Paediatrics**, v.30, n.4, p.299-304, 2010.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICZ, C.H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.19-23, 2009.

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. Caloric value of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1436-1437, 1999.

ROBERFROID, M.B. General introduction: prebiotics in nutrition. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008a. cap.1, p.1-12.

ROBERFROID, M.B. **Inulin-type fructans**: functional food ingredients. Boca Raton: London: CRC, 2005. 359p. (Modern nutrition).

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008b. cap.3, p.39-67.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, p.830-837, 2007.

ROSS, R.P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.96-104, 2000.

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

SAAD, S.M.I.; CARDARELLI, H.R.; MARUYAMA, L.Y. Queijo probiótico e/ou prebiótico, seu processo de fabricação e uso. BR n.P.I. 0702.111-9, 31 maio 2007. **Revista de Propriedade Intelectual**, item 3.1, n.1985, 2009. p.73.

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, 2011. cap.1, p.23-49.

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

SANCHÉZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A. The F1F0-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. **Environmental Microbiology**, v.8, n.10, p.1825-1833, 2006.

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

SANTOS, K.M.O.; BOMFIM, M.A.D.; VIEIRA, A.D.S.; BENEVIDES, S.D.; SAAD, S.M.I.; BURITI, F.C.A.; EGITO, A.S. Probiotic caprine coalho cheese naturally

enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v.24, p.107-112, 2012.

SANTOS, K.O.; EGITO, A.S.; BOMFIM, M.A.D.; BENEVIDES, S.D. **Produção de queijos probióticos para agregação de valor ao leite caprino**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008. 21p. (Documentos *on line*, 83). Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/doc83.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2010.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v.17, p.1284–1289, 2007.

SAVARD, P.; LAMARCHE, B.; PARADIS, M.E.; THIBOUTOT, H.; LAURIN, E.; ROY, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.50–57, 2011.

SAXELIN, M.; LASSIG, A.; KARJALAINEN, H.; TYNKKYNEN, S.; SURAKKA, A.; VAPAATALO, H.; JÄRVENPÄÄ, S.; KORPELA, R.; MUTANEN, M.; HATAKKA, K. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.293–300, 2010.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M.; Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.361–364, 2001.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. *Bifidobacterium* spp. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F., eds. **Encyclopedia of dairy sciences**. Amsterdam: Academic Press, 2003. v.1, p.141-151.

SINGH, R.P.; DAMLE, S.G.; CHAWLA, A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.69, n.6, p.389-394, 2011.

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, n.5, p.871-877, 2008.

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.

SRINIVAS, D.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p.51-58, 1990.

SRISUVOR, N.; CHINPRAHAST, N.; PRAKITCHAIWATTANA, C.; SUBHIMAROS, S. Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. **LWT - Food Science and Technology**, v.51, p.30-36, 2013.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.181-194, 2007.

TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1107-1114, 2007.

TAILLANDIER, P.; GILIS, F.; PORTUGAL, F.R.; LAFORCE, P.; STREHAIANO, P. Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Letters**, v.18, p.775-780, 1996.

TAIPALE, T.; PIENIHÄKKINEN, K.; ISOLAURI, E.; LARSEN, C.; BROCKMANN, E.; ALANEN, P.; JOKELA, J.; SÖDERLING, E. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. **British Journal of Nutrition**, v.105, n.3, p.409-416, 2011.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamentos. Alimentos. Links de Interesse. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 22 jan. 2013.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714-728, 2008. [Review].

VAUGHAN, E.E.; HEILIG, H.G.H.J.; BEM-AMOR, K.; VOS, W.M. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.477-490, 2005.

VEIGA, P.G.; CUNHA, R.L.; VIOTTO, W.H.; PETENATE, A.J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial de queijo *petit-suisse* brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.349-357, 2000.

VILLARREAL, M.L.; FRANCO, B.D.G.M.; SAAD, S.M.I. Isolation of bacterial DNA from probiotic *petit-suisse* cheese. In: CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS, FEMS 2011, 4, Genebra, 2011. **Proceedings**. Delft: FEMS, 2011.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, p.579-589, 2002.

VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.4, p.721-729, 2002.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1905-1911, 2000.

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.

WALJI, R.; BOON, H. Natural health product regulations: perceptions and impact. **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p.494-497, 2008.

WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.6, p.2468-2476, 2009.

WELLS, A.L.; SAULNIER, D.M.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut mucosa. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., eds. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.2, p.13-38.

WILDT, S.; MUNK, L.K.; VINTER-JENSEN, L.; HANSE, 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 Disease**, v.12, n.5, p.395-401, 2006.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.1, p.3-10, 2010.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **Guias práticas: probióticos e prebióticos**. [S.l.]: OMGE, 2008. 22p. Disponível em: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_pt.pdf. Acesso em: 03 abr. 2013.

YOUNG, R.J.; HUFFMAN, S. Probiotic use in children. **Journal of Pediatric Health Care**, v.17, n.6, p.277-283, 2003.

ZOETENDAL, E.G.; COLLIER, C.T.; KOIKE, S.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. **Journal of Nutrition**, v.134, p.465–472, 2004.

ZOETENDAL, E.G.; HEILIG, H.G.H.J.; KLAASSENS, E.S.; BOOIJINK, C.C.G.M.; KLEEREBEZEM, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M. Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. **Nature Protocols**, v.1, p.870-873, 2006.

ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M. A microbial world within us. **Molecular Microbiology**, v.59, p.1639-1650, 2006.

ANEXO A - Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/108/2011
Protocolo CEP/FCF/581
CAAE: 0025.0.018.000-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Queijo <i>petit-suisse</i> probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência <i>in vitro</i>.
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Aluna de Pós-Graduação:	Marina Padilha
Instituição:	FCF-USP

II - Sumário Geral do Protocolo:

Avaliar a sobrevivência de cepas probióticas incorporadas em queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e simbiótico no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no trato gastrointestinal. O delineamento experimental será constituído de 3 tratamentos de queijo: QP (*petit-suisse* probiótico, com cultura ABT); QS (queijo simbiótico, com os probióticos e prebióticos - cultura ABT + inulina e fruto-oligossacarídeo) e QC (queijo controle, sem a adição de probióticos e prebióticos). Os queijos serão armazenados por até 28 dias a 4±1°C. Serão avaliados parâmetros microbiológicos, de textura instrumental e sensorial.

Os objetivos do presente estudo são:

Avaliar a sobrevivência de cepas probióticas da cultura ABT, incorporadas em queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico e simbiótico no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no TGI, utilizando técnicas independentes de cultivo, paralelamente aos métodos convencionais;

Avaliar a influência do ingrediente prebiótico sobre a sobrevivência de cepas probióticas incorporadas em queijo *petit-suisse* no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro* frente às condições encontradas no TGI;

Verificar a aceitabilidade sensorial e outras características tecnológicas relacionadas dos queijos *petit-suisse* probiótico e simbiótico frente a um produto elaborado sem a adição desses ingredientes funcionais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Descrição da Casuística:

Características: A avaliação de aceitabilidade de 3 amostras (20 g cada): queijo controle (sem adição), queijo com probiótico e queijo com probiótico e prebiótico será medida através do preenchimento da ficha para teste de aceitabilidade, variando de desgostei muitíssimo (nota 1) a gostei muitíssimo (nota 9).

A análise sensorial será realizada nos produtos após o armazenamento por 7, 14 e 21 dias

Número de participantes: de 50 até 450 indivíduos (no projeto) e no TCLE: 450.

Procedência: funcionários e estudantes da FCF/USP.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 01 de julho de 2011.

O pesquisador deverá:

- 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 relatório parcial em dez/2011 e relatório final em dez/2012.

São Paulo, 04 de julho de 2011.

Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO B - Modelo de Ficha para Teste de Aceitabilidade

FICHA PARA TESTE DE ACEITABILIDADE

Nome: _____ Data: ____/____/____

AMOSTRA: _____

Por favor, prove a amostra que você acabou de receber e, em seguida, circule o número na escala abaixo que indique a sua opinião geral sobre o produto.

9 = gostei muitíssimo

8 = gostei muito

7 = gostei moderadamente

6 = gostei ligeiramente

5 = nem gostei nem desgostei

4 = desgostei ligeiramente

3 = desgostei moderadamente

2 = desgostei muito

1 = desgostei muitíssimo

Cite o atributo que você mais gostou na amostra, comente:

Cite o atributo que você menos gostou na amostra, comente:

ANEXO C - Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:			
Documento de Identidade nº:			Sexo: () M () F
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		
Título do Projeto de Pesquisa: Queijo <i>petit-suisse</i> probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência <i>in vitro</i> .			
Duração da Pesquisa: 2 anos (análise sensorial será realizada a partir de agosto de 2011).			
Nome do pesquisador responsável: Profª. Drª. Susana Marta Isay Saad			
Cargo/ Função: Professora Associada		Nº do Registro do Conselho Regional: CRF-8: 9541	
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP			

Você foi convidado para participar da análise sensorial de um queijo *petit-suisse* adicionado de micro-organismos que contribuem para função intestinal (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) e fibra alimentar solúvel (inulina e fruto-oligossacarídeos). Queijos são alimentos que sugerem um grande potencial como veículo de micro-organismos que contribuem para função intestinal e embora seja um alimento tradicionalmente direcionado à população infantil, o queijo *petit-suisse* é consumido por todas as idades. A inclusão de micro-organismos que contribuem para saúde no *petit-suisse* é um modo de levar ao consumidor seus benefícios de forma prazerosa. Além disso, a combinação de micro-organismos que contribuem para função intestinal e fibra alimentar solúvel agrega ainda mais valor ao alimento. O desenvolvimento deste produto é feito pela mestrandia Marina Padilha, 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 Bioquímica-Farmacêutica FCF/USP. 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 pode possuir: leite desnatado, creme de leite, polpa de morango, sacarose, goma guar, goma carragena, goma xantana, aroma natural ideôntico ao de morango, corante artificial, ácido cítrico, sorbato de potássio, inulina, fruto-oligossacarídeos e micro-organismos que contribuem com a função intestinal (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12). 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; não possuir histórico de manifestação de alergia ou intolerância ou outro tipo de restrição (como doença crônica ou tratamento médico com uso de medicamentos que podem interagir) com os ingredientes; não deve estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte. Atendendo a essas condições você poderá participar da análise sensorial do *petit-suisse*. Caso você tenha menos de 18 anos ou mais de 60 anos, histórico de manifestação de alergia, intolerância ou outro tipo de restrição com os ingredientes do *petit-suisse*, esteja gripado, resfriado ou indisposto ou tenha entrado em contato com materiais alimentos ou cosméticos com cheiro forte, você não poderá participar desta análise.

Você receberá três amostras, uma de cada vez, cada uma com uma ficha de avaliação. A amostra contém aproximadamente 20 g de *petit-suisse*. 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.

Sua participação é livre e você poderá comparecer no máximo uma vez a cada dia para de análise sensorial deste produto.

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, com alimentos contendo micro-organismos que contribuem para função intestinal e fibras alimentares solúveis nas proporções adicionadas à este produto. Os demais ingredientes são reconhecidamente seguros, os possíveis desconfortos são mínimos.

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

Caso você não queira continuar participando da pesquisa, a qualquer momento você pode desistir, sem que haja qualquer prejuízo. 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.

Serão adotados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sintam obrigados a participarem do estudo.

Não haverá remuneração financeira aos participantes das análises sensoriais.

Em caso de intercorrências clínicas e reações adversas durante o estudo, o voluntário deverá procurar o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 . Cid. Universitária . (11) 3091-9200.

Os responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa estarão à disposição para contato:

Marina Padilha 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 ou (11) 3091-2691

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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 da pesquisadora responsável

Susana Marta Isay Saad

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900. Fone: 3091-3622, fone-fax: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO D – Imagem representativa da regressão linear obtida a partir das curvas padrão em reação de PCR em tempo real (qPCR), para *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (D.1), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (D.2) e *Streptococcus thermophilus* (D.3).

D.1

D.2

D.3

ANEXO E - Imagem representativa da curva de dissociação obtida a partir de reação de PCR em tempo real (qPCR), para *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (E.1), e *Streptococcus thermophilus* (E.2).

E.1

E.2