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

Desenvolvimento de queijo *petit-suisse* simbiótico

Haíssa Roberta Cardarelli

Tese para obtenção do grau de
Doutor

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

São Paulo
2006

Ficha Catalográfica

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

C266d Cardarelli, Haissa Roberta
Desenvolvimento de queijo *petit-suisse* simbiótico / Haissa
Roberta Cardarelli. -- São Paulo, 2006.
133p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Saad, Susana Marta Isay

I. Tecnologia de alimentos 2. Queijo I. T. II. Saad,
Susana Marta Isay, orientador.

664 CDD

Haíssa Roberta Cardarelli

Desenvolvimento de queijo *petit-suisse* simbiótico

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
orientador/presidente

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Ana Lucia Barreto Penna

Ariene Gimenes Fernandes Van Dender

Inar Alves de Castro

São Paulo, 04 de agosto de 2006.

**Para minha família, sempre rezando a Deus por mim e sendo sinônimo de amor
e suporte incondicionais**

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad, pela orientação, paciência e apoio durante esta pesquisa, e ao nosso querido grupo de professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Especial agradecimento à grande amiga Flávia Carolina Alonso Buriti, que muito me ajudou em momentos de intenso trabalho e pelas boas conversas.

À querida amiga Renata Torrezan, pelo convívio na Inglaterra.

Ao amigo Alexandre da Silva Simões, que me incentivou a vir para São Paulo.

À Prof.^a Dr.^a Tullia Maria Clara Caterina Filisetti, que, logo em minha chegada, opinou quanto ao meu projeto, orientação e técnica na análise de frutanos.

À Prof.^a Beatriz Rosana Cordenunsi e à técnica Tania Misuzu Shiga do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – FCF/USP, pelo auxílio na execução da análise de frutanos.

À Prof.^a Dr.^a Inar Alves de Castro, pelo imenso auxílio no planejamento experimental, nas análises estatísticas e na análise sensorial.

À bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros, pela correção das referências bibliográficas apresentadas nesta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos (Processos FAPESP 02/14185-8 e 03/13748-1).

À CAPES pelo auxílio financeiro através da verba PROAP.

À Pró-Reitoria de Pesquisa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, pela concessão das passagens aéreas, utilizadas na viagem de estágio realizado na

Universidade de Reading na Inglaterra, através do projeto “Complementação de auxílio a doutorandos para estágio de pesquisa no exterior”.

Às empresas Salute, Danisco, Orafti, Rhodia, Mylner, Plury Química e 3M Microbiology, pelo fornecimento de parte dos recursos materiais empregados nesta pesquisa.

À empresa Orafti, pelo suporte financeiro concedido para o pagamento da taxa de bancada do estágio realizado no exterior.

Ao professor Glenn Gibson, por propiciar-me a possibilidade de estagiar com seu grupo de pesquisa na Universidade de Reading, à pesquisadora Jelena Vulevic pela supervisão durante meus trabalhos em Reading e aos colegas que me apoiaram durante os momentos em que estive longe de minha família e do Brasil.

RESUMO

A associação de ingredientes prebióticos com microrganismos probióticos na elaboração de produtos lácteos pode resultar na obtenção de produtos simbióticos, com os efeitos benéficos dos probióticos, aliado ao estímulo seletivo das bifidobactérias endógenas do cólon. Objetivou-se desenvolver um queijo *petit-suisse* simbiótico, suplementado com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e os prebióticos inulina, oligofrutose e mel; avaliar a viabilidade dos probióticos e do *starter*, a concentração de frutanos, a aceitabilidade sensorial e parâmetros físico-químicos durante o seu armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 28 dias; otimizar as misturas envolvendo os prebióticos, garantindo a boa viabilidade probiótica e o potencial efeito prebiótico, associados a características tecnológicas e sensoriais satisfatórias.

Para esse fim, foram desenvolvidas formulações de queijo *petit-suisse*, com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, utilizando *Streptococcus thermophilus* como *starter*, conforme o delineamento da superfície de resposta para misturas com três fatores: oligofrutose, inulina e mel. Os fatores foram combinados em diferentes proporções, de modo a obter 10% da formulação final, totalizando 7 ensaios e um controle (T1 a T8).

As populações dos probióticos estiveram sempre superiores ao recomendado para a promoção dos efeitos benéficos, tendo variado de 7,20 a 7,69 log ufc g⁻¹ (*B. lactis*) e de 6,08 a 6,99 log ufc g⁻¹ (*L. acidophilus*). Os valores de pH decresceram e de acidez cresceram ao longo do tempo, devido à atividade dos microrganismos acidificantes presentes, tendo diferido significativamente entre os ensaios ($p<0,05$). A umidade permaneceu estável e diferiu significativamente entre os ensaios ($p<0,05$).

O ingrediente que mais afetou a textura instrumental foi a inulina, fornecendo produtos mais firmes, mais coesos e com adesividade e gomosidade maiores. Oligofrutose e mel, como ingredientes únicos, produziram queijo *petit-suisse* com menor firmeza, adesividade e gomosidade, parâmetros estes correlacionados negativamente com o pH nos diferentes produtos estudados, ao contrário do que ocorreu com a coesividade.

Os ensaios não diferiram significativamente quanto à aceitabilidade sensorial com painel de consumidores, exceto aos 28 dias de armazenamento ($p<0,05$). Aqueles contendo oligofrutose (T1) e oligofrutose mais inulina (T4) foram os mais bem aceitos, enquanto o controle (T8) foi o menos aceito. Todos os resultados ficaram entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. A aceitabilidade foi crescente durante o armazenamento, significativamente ($p<0,05$) apenas para os ensaios que continham oligofrutose ou inulina sozinhos e sua combinação. Os atributos mais citados pelos consumidores foram o sabor - mais preferido nos ensaios T1 (oligofrutose), T3 (mel) e T5 (oligofrutose mais mel) e menos preferido no T8 (controle), e a textura, sempre menos preferida, em virtude de ‘arenosidade’.

Todas as combinações dos ensaios estudadas, exceto o T3 (mel), podem ser consideradas prebióticas, partindo-se da recomendação de 4 a 5 g dia⁻¹ de frutanos e com uma porção diária de 100 g de queijo *petit-suisse*. A Metodologia da Superfície de Resposta aplicada para otimizar a viabilidade dos probióticos, a firmeza instrumental, o teor de frutanos e o custo, resultou na mistura ótima contendo 25% de oligofrutose, 70% de inulina e 5% de mel e desejabilidade global de 99,55%.

ABSTRACT

Due to the potential synergy between probiotics and prebiotics, dairy products containing a combination of these ingredients are often referred to as synbiotic, providing the beneficial effects of the probiotics combined with the effect of selectively stimulating the growth and/or activity of bifidobacterium in the colon. The purpose of this study was to develop a synbiotic *petit-suisse* cheese, supplemented with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and the prebiotics inulin, oligofructose and honey; to monitor the viability of the probiotics and the *starter*, the concentration of fructans, and also the sensory acceptance and physico-chemical parameters during refrigerated storage ($4\pm1^{\circ}\text{C}$) for up to 28 days; to optimize the mixtures involving the prebiotic ingredients, in order to guarantee good probiotic viability and potential prebiotic effects, together with to satisfactory technological and sensory properties.

The formulations were developed according to the surface response methodology for mixtures including three factors: oligofructose, inulin and honey. The prebiotics were combined in different proportions (to achieve 10% of total mixture), and 7 trials plus a control trial were obtained (T1 to T8).

Probiotic populations were always above the minimum counts suggested for providing health benefits, and varied from 7.20 up to 7.69 log cfu g⁻¹ (*B. lactis*) and from 6.08 up to 6.99 log cfu g⁻¹ (*L. acidophilus*). The pH values decreased and the acidity values increased significantly during storage, and were statistically different in the various trials ($P<0.05$), due to the acidifying effect of the organisms present. The moisture remained stable during storage and also varied statistically in the trials ($P<0.05$).

Instrumental texture profile was greatly influenced by inulin, resulting in firmer, more cohesive and adhesive products, and with higher gumminess. Oligofructose and honey added as sole ingredients produced a less firm, adhesive and gummy cheese. The pH influenced the instrumental firmness, adhesiveness and gumminess negatively, and cohesiveness positively.

There was no significant difference in sensory acceptance for the consumer panel between the different trials, except after 28 days of storage ($P<0.05$). The acceptance was significantly higher for cheeses supplemented with oligofructose (T1) and oligofructose plus inulin (T4), whereas the control (T8) was less accepted. The results always ranged from like slightly to like moderately. Acceptability increased during storage, though significantly ($P<0.05$) only for cheeses supplemented with oligofructose and/or inulin. Taste was the most preferred attribute for trials T1 (oligofructose), T3 (honey), and T5 (oligofructose plus honey) and less preferred for T8 (control). Texture attribute was always the least preferred, due to the 'dust' present.

All cheese trials, except T3 (honey), can be considered prebiotic, according to the recommended ingestion of 4 to 5 g day⁻¹ of fructans for a 100g daily portion. The response surface methodology, applied to optimize probiotic viability, instrumental firmness, fructans content and cost, resulted in an optimum mixture containing 25% oligofructose, 70% inulin and 5% honey and global desirability of 99.55%.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Frutano tipo inulina.....	11
Figura 2. (a) Texturômetro – TA-XT2 empregado para medir o perfil de textura instrumental; (b) curva típica obtida para teste com dupla compressão.....	25
Figura 3. Representação espacial de misturas	30
Figura 4. Fluxograma empregado na elaboração da massa-base de queijo Quark.....	35
Figura 5. Fluxograma empregado na elaboração de queijo <i>petit-suisse</i>	36
Figura 6. Evolução da firmeza ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados	63
Figura 7. Evolução da adesividade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.....	65
Figura 8. Evolução da elasticidade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.....	66
Figura 9. Evolução da coesividade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.....	67
Figura 10. Evolução da gomosidade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.....	68
Figura 11. Freqüências para os atributos preferidos e não preferidos mencionados pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento e ensaios dos queijos estudados, onde os números sobre as barras correspondem ao número de vezes em que o atributo foi citado	81
Figura 12. Freqüências para o atributo sabor preferido e não-preferido, mencionados pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento dos queijos estudados.....	82
Figura 13. Freqüências para o atributo de textura preferido e não-preferido, mencionado pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento dos queijos estudados	83
Figura 14. Diagrama triangular para a variável-resposta <i>L. acidophilus</i> (log ufc g ⁻¹) aos 21 dias de armazenamento dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente	89
Figura 15. Diagrama triangular para a variável-resposta <i>B. lactis</i> (log ufc g ⁻¹) aos 21 dias de armazenamento dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.....	89

Figura 16. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta firmeza (N) aos 21 dias de armazenamento dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.....	90
Figura 17. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta conteúdo de frutanos (%) aos 21 dias de armazenamento dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.....	90
Figura 18. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta custo dos ingredientes prebióticos (R\$ Kg ⁻¹) dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente	91
Figura 19. Perfis para valores preditivos e desejabilidade para as variáveis otimizadas e desejabilidade global, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes empregados para a formulação do queijo <i>petit-suisse</i> e suas respectivas quantidades.....	37
Tabela 2. Delineamento experimental empregado.....	38
Tabela 3. Viabilidade dos microrganismos probióticos <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> , expressa em média [desvio padrão] log ufc g ⁻¹ , obtida para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante armazenamento a 4±1 °C.....	48
Tabela 4. Viabilidade do microrganismo <i>starter Streptococcus thermophilus</i> , expressa em média [desvio padrão] log ufc g ⁻¹ , obtida para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante o armazenamento a 4±1 °C..	52
Tabela 5. Populações de <i>Staphylococcus</i> spp., expressas em média [variação] log ufc g ⁻¹ , obtidas para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante o armazenamento a 4±1 °C.....	54
Tabela 6. Populações de bolores e leveduras, expressas em média [variação] log ufc g ⁻¹ , obtidas para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante o armazenamento a 4±1 °C	56
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos, expressos em média [desvio padrão], obtidos para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante armazenamento a 4±1 °C	58
Tabela 8. Parâmetros de textura instrumental, expressos em média [desvio padrão], obtidos para os queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante armazenamento a 4±1 °C..	62
Tabela 9. Coeficientes de correlação entre pH e firmeza para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 0,01% (p<0,00001).....	64
Tabela 10. Coeficientes de correlação entre pH e adesividade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% (p<0,01).....	65
Tabela 11. Coeficientes de correlação entre pH e coesividade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% (p<0,01).....	67
Tabela 12. Coeficientes de correlação entre pH e gomosidade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% (p<0,01).....	68
Tabela 13. Resultados de teor de frutanos, expressos em % médio [desvio padrão], dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados durante armazenamento a 4±1 °C.	70
Tabela 14. Coeficientes de correlação entre conteúdo de frutanos e pH para os ensaios T1-T7, calculados com resultados médios entre os períodos de armazenamento	71

Tabela 15. Teor de gordura, proteína, cinzas, umidade e carboidratos totais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os queijos quark – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT) após 1 dia de armazenamento sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).	73
Tabela 16. Teor de gordura, proteína, cinzas e carboidratos totais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos para os queijos petit-suisse no produto final – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT), após 1 dia de armazenamento sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).	74
Tabela 17. Resultados de aceitabilidade sensorial dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados, expressos por média [desvio padrão] da escala de pontos de 1 a 9... ..	78
Tabela 18. Coeficientes de correlação entre aceitabilidade e parâmetros de textura instrumental para os ensaios T1-T8, calculados com resultados médios entre os períodos de armazenamento.....	79
Tabela 19. Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão, para o modelo cúbico, a partir dos resultados experimentais de contagem das bactérias probióticas <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> , do parâmetro de textura instrumental firmeza, do conteúdo de frutanos e do custo dos ingredientes prebióticos nos queijos <i>petit-suisse</i> estudados.....	85
Tabela 20. Análise de variância do modelo cúbico especial ajustado aos dados experimentais da contagem da bactéria probiótica <i>L. acidophilus</i> nos queijos <i>petit-suisse</i> estudados.....	85
Tabela 21. Análise de variância do modelo cúbico especial ajustado aos dados experimentais da contagem da bactéria probiótica <i>B. lactis</i> nos queijos <i>petit-suisse</i> estudados.....	86
Tabela 22. Análise de variância do modelo cúbico especial ajustado aos dados experimentais do atributo de textura firmeza nos queijos <i>petit-suisse</i> estudados....	86
Tabela 23. Análise de variância do modelo cúbico especial ajustado aos dados experimentais do conteúdo de frutanos nos queijos <i>petit-suisse</i> estudados.....	86
Tabela 24. Proporção dos ingredientes prebióticos adicionados para a realização dos ensaios de validação	91
Tabela 25. Resultados de viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e de <i>B. lactis</i> (média [desvio padrão] log ufc g ⁻¹), firmeza média ([desvio padrão] N) e de conteúdo de frutanos (% médio [desvio padrão]) dos queijos <i>petit-suisse</i> estudados nos ensaios de validação, aos 21 dias de armazenamento.	92

Tabela 26. Comparação entre os valores estimados pelos modelos polinomiais e os valores medidos experimentalmente nos ensaios de validação.....	92
Tabela 27. Valores atribuídos no procedimento de otimização matemática realizado, empregando o programa Statistica 7.0 (Statsoft).	93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alimentos funcionais	1
1.2. Probióticos	1
1.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp.	4
1.2.2. Produtos alimentícios contendo probióticos	7
1.3. Prebióticos	10
1.3.1. Frutanos como prebióticos	11
1.3.1.1. Inulina e oligofrutose	14
1.3.1.1.1. Inulina e oligofrutose – aplicações em alimentos	16
1.3.2. Oligossacarídeos do mel como prebióticos	17
1.4. Alimentos simbióticos	18
1.5. Produtos lácteos	19
1.5.1. Queijo <i>quark</i>	19
1.5.2. Queijo <i>petit-suisse</i>	21
1.5.3. Emprego de culturas lácticas em queijos	23
1.5.3.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	23
1.5.4. Textura em queijos	25
1.6. Metodologia de superfície de resposta e otimização	27
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Elaboração dos queijos	34
3.1.1. Ingredientes e aditivos	34
3.1.2. Elaboração do queijo <i>quark</i>	35
3.1.3. Elaboração do queijo <i>petit-suisse</i>	36
3.1.4. Formulação do queijo <i>petit-suisse</i>	37
3.2. Delineamento experimental	38
3.3. Períodos de amostragem	39
3.4. Determinação dos parâmetros físico-químicos	39
3.5. Determinação da textura instrumental	39
3.6. Determinação da composição centesimal	40
3.7. Determinação dos parâmetros microbiológicos	40
3.8. Determinação quantitativa de frutanos	41

3.9. Avaliação sensorial de alimentos	42
3.9.1. Provadores	43
3.9.2. Ficha de resposta	44
3.9.3. Procedimento	44
3.10. Análise estatística	45
3.10.1. Otimização	45
3.10.2. Outras análises estatísticas realizadas	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Microrganismos probióticos e <i>starter</i>	47
4.1.1. Probióticos	47
4.1.2. <i>Starter</i>	51
4.2. Microrganismos contaminantes	53
4.2.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	53
4.2.2. Coliformes e <i>E. coli</i>	55
4.2.3. Bolores e leveduras	55
4.3. Parâmetros físico-químicos de pH, acidez titulável e umidade	57
4.3.1. pH e acidez titulável	57
4.3.2. Umidade	60
4.4. Perfil de textura instrumental	61
4.5. Conteúdo de frutanos	69
4.6. Composição centesimal	72
4.7. Avaliação sensorial	74
4.7.1. Aceitabilidade	74
4.7.2. Associação entre aceitabilidade e textura instrumental	78
4.7.3. Comparações entre os atributos sensoriais	80
4.8. Otimização através da metodologia de superfície de resposta (RSM)	83
4.8.1. Obtenção dos modelos de regressão	84
4.8.2. Validação dos modelos de regressão obtidos	91
4.8.3. Otimização empregando o <i>software Statistica 7.0</i>	92
5. CONCLUSÕES	96
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO 1 – Modelo da ficha aplicada na avaliação sensorial	129

ANEXO 2 – Modelo da ficha utilizada para recrutamento dos participantes da avaliação sensorial.....	130
ANEXO 3 – Ofício da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas aprovando a realização da avaliação sensorial.....	132
ANEXO 4 – Informações para os membros das bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alimentos funcionais

Atualmente, a dieta é considerada o fator mais importante para a saúde, e o desenvolvimento de alimentos que promovam a saúde e o bem-estar é uma das prioridades de pesquisa para as indústrias alimentícias. Isso favorece o consumo de alimentos enriquecidos com compostos ativos fisiologicamente (BETORET *et al.*, 2003; JANER *et al.*, 2004). Alimentos funcionais são definidos como quaisquer alimentos ou ingredientes alimentares capazes de promover benefícios à saúde, além de possuírem os nutrientes já tradicionais (WILDMAN, 2001). Alguns aspectos que contribuem para o crescente interesse pelos alimentos funcionais são o aumento na expectativa de vida da população e o crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares (ROBERFROID, 2002a).

A legislação brasileira considera: a) a alegação de propriedade funcional como aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico da substância no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; b) a alegação de propriedade de saúde como aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

Um grande número de alimentos funcionais tem sido introduzido no mercado mundial; muitos deles contêm um ou mais ingredientes com características funcionais. Assim, pode-se incluir a fibra alimentar, os oligossacarídeos, os peptídeos, as proteínas, os prebióticos, os probióticos, os simbióticos, os fitoquímicos, os antioxidantes e os ácidos graxos poliinsaturados (KWAK e JUKES, 2001).

1.2. Probióticos

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. Essa composição torna o intestino capaz de responder a possíveis variações anatômicas e físico-químicas (LEE *et al.*, 1999). A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos patogênicos. Por outro lado, o desequilíbrio desta microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER e GIBSON, 1998).

A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente no trato gastrointestinal. A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada pode ser realizada pelos probióticos (ISOLAURI *et al.*, 2004).

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levou ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes (GIBSON e FULLER, 2000). É possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal através da introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de um tipo específico de suplemento alimentar denominado prebiótico, o qual irá modificar seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema (CRITTENDEN, 1999).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas os quais mais se destacam são: promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação e modulação do sistema imune; modulação da imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal; efeitos anti-carcinogênicos - como a redução do risco de câncer de cólon; diminuição do risco de doença cardiovascular; redução dos níveis séricos de colesterol; controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; efeitos anti-hipertensivos; redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; prevenção de infecções urogenitais; alívio da constipação; produção de vitaminas; aumento da absorção de minerais; efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade; diminuição da população de patógenos através da produção dos ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos (SHAH e LANKAPUTHRA,

1997; CHARTERIS *et al.*, 1998; JELEN e LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR *et al.*, 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002; FIORAMONTI *et al.*, 2003; TUOHY *et al.*, 2003; SAAD, 2006).

Alguns critérios são exigidos para que bactérias probióticas sejam assim classificadas: a. devem possuir boas propriedades tecnológicas que permitam seu processamento e incorporação aos produtos alimentícios, sem perda de viabilidade e funcionalidade e que não produzam substâncias indesejáveis quanto ao *flavor* e textura; b. devem sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal e chegarem vivos no local de ação; c. devem ser capazes de se desenvolverem e atuarem no ambiente do intestino grosso; d. os gêneros aos quais pertencem as bactérias devem ser de origem humana; e. devem ser seguras para consumo humano, ter histórico de não patogenicidade e não possuírem genes determinantes de resistência a antibióticos (ZIEMER e GIBSON, 1998; COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000).

Os gêneros mais comumente empregados têm sido os lactobacilos e as bifidobactérias (SAARELA *et al.*, 2000). Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHARTERIS *et al.*, 1998; BIELECKA *et al.*, 2002). Entretanto, deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Uma seleção adequada de cepas deve ser conduzida para o processamento de produtos lácteos probióticos (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003). A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício deve ser tal que alcance populações acima de 10^6 ufc ml^{-1} para apresentar efeitos fisiológicos no consumidor (SHAH, 2000; BETORET *et al.*, 2003). Para que populações de 10^6 a 10^7 ufc g^{-1} cheguem ao intestino e atuem fisiologicamente, deve-se consumir cerca de 100g do produto (10^8 a 10^9 ufc) (CHARTERIS *et al.*, 1998).

Entretanto, deve ser salientado que de acordo com a nova definição de probióticos aceita internacionalmente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001), microrganismos administrados vivos são considerados probióticos independentemente da sua capacidade de sobreviver ao trânsito intestinal (REID *et al.*, 2003).

1.2.1. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp.

L. acidophilus e bifidobactérias são os microrganismos probióticos mais utilizados na tecnologia de produtos lácteos (SAARELA *et al.*, 2000).

O gênero *Lactobacillus* constitui a microbiota natural do trato gastrintestinal e genital dos animais e do homem (GOMES e MALCATA, 1999). *Lactobacillus acidophilus* é um bastonete não-flagelado, não-formador de esporos, Gram-positivo, intolerante ao sal. É microaerofílico ou anaeróbico e fermentador estrito, produtor de ácido lático e pequena quantidade de acetaldeído, como produtos do metabolismo da lactose. Sua multiplicação pode ocorrer em temperatura de até 45°C, mas a temperatura ótima está entre 35 e 40°C. O pH ótimo para multiplicação está entre 5,5 e 6,0 (GOMES e MALCATA, 1999).

As bifidobactérias são bastonetes Gram-positivos e, freqüentemente, têm a forma bífida, são anaeróbios e têm requisitos nutricionais especiais para se multiplicarem em condições de laboratório. A população de bifidobactérias no intestino tende a ser constante, mas é influenciada pela dieta, antibióticos, estresse e outros fatores. As bifidobactérias multiplicam-se entre 20 e 46°C e morrem a 60°C e o pH ótimo está entre 6,5 e 7, não havendo multiplicação em pH inferior a 5,1 ou superior a 8,0. Elas possuem as enzimas superóxido dismutase e catalase, que auxiliam na proteção contra efeitos tóxicos de superóxido e peróxido de hidrogênio (ARUNACHALAM, 1999).

Segundo SHAH (2001), cepas de *L. acidophilus* e *L. casei* produzem, como produto final do seu metabolismo fermentativo, principalmente ácido lático, enquanto as bifidobactérias produzem ácido acético e ácido lático na proporção molar de 3:1. *L. acidophilus* e bifidobactérias têm sido relatados como sintetizadores de ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e vitamina K (GOMES e MALCATA, 1999).

Bifidobacterium e *Lactobacillus* monitoradas durante tratamento de infecções intestinais estão envolvidas na estabilização da barreira da mucosa intestinal, na prevenção de diarreias e na redução de diarreia infantil e diarreias associadas a antibióticos (LEE *et al.*, 1999). A resposta imune pode ser aumentada quando um ou mais probióticos são consumidos simultaneamente, atuando sinergisticamente, e isto parece ocorrer quando *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são administrados conjuntamente (KOPP-HOOLIHAN, 2001, CALDER e KEW, 2002, VAN DE WATER, 2003).

Alguns pesquisadores relatam que cepas de *L. acidophilus* apresentam atividade antimicrobiana sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem apresentar atividade sobre outros lactobacilos e bifidobactérias (MITAL e GARG, 1995; BERNET-CAMARD *et al.*, 1997).

Segundo COCONNIER e SERVIN (2003), cepas de *Lactobacillus* isoladas do trato digestivo humano têm atuado na inibição de quatro espécies de bactérias anaeróbicas conhecidas como agentes etiológicos de infecções gastroentéricas: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Clostridium difficile*. Estudos *in vitro* realizados com *L. acidophilus* e outros representantes do grupo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* revelaram a inibição da multiplicação de *H. pylori* isolados de casos clínicos. Além disso, *L. acidophilus* foi ativo contra infecções experimentais com *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* e *Shigella flexneri* em ratos gnotobióticos, além de conferir proteção contra infecções estomacais com *H. felis*, inibindo a colonização do estômago e eliminando lesões gástricas.

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

A seleção das culturas de bifidobactérias ideais para a elaboração de produtos fermentados de leite envolve propriedades específicas como a razão de produção de ácido, o tipo de fermentação de polissacarídeos, as características de proteólise (algumas produzem compostos amargos), sua capacidade de produzir

compostos de aroma, a habilidade de sintetizar vitaminas e, finalmente, as propriedades benéficas à saúde (ARUNACHALAM, 1999).

Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. serem consideradas seguras (GRAS - “generally recognized as safe”), é necessária a determinação da segurança na utilização da cepa antes do lançamento e da divulgação de um novo produto. Assim, uma avaliação crítica da segurança torna os benefícios dos probióticos acessíveis ao consumidor (SALMINEN *et al.*, 1998; O'BRIEN *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos envolvendo a fabricação de produtos fermentados de leite contendo *L. acidophilus* como probiótico, com efeito potencial de aumentar a digestão da lactose (VESA *et al.*, 1996), prevenir a diarreia do viajante (OKSANEN, 1990), reduzir a duração da diarreia provocada por rotavírus (GUARINO *et al.*, 1998), exercer atividade anti-cancerígena (POOL-ZOBEL, 1993a e POOL-ZOBEL, 1993b), melhorar a atividade do sistema imune (SCHIFFRIN *et al.*, 1994; NEUMANN *et al.*, 1998; PERDIGÓN *et al.*, 1999; MEYDANI e HA, 2000), auxiliar no controle do colesterol sérico (GILLILAND *et al.*, 1985), proteger o trato uro-genital (REID, 2001), proteger contra infecções por patógenos (MOURA *et al.*, 2001), entre outros.

HOLZAPFEL *et al.* (1998) fazem uma revisão sobre alguns estudos *in vivo* e *in vitro* com *L. acidophilus* e bifidobactérias veiculados através de produtos lácteos e seus efeitos sobre imunomodulação e fortalecimento da barreira da mucosa intestinal, aumento da resistência a patógenos, redução de gastroenterites e propriedades anticarcinogênicas. Os benefícios à saúde que têm sido atribuídos às bifidobactérias incluem alívio da intolerância à lactose, inibição de microrganismos patogênicos e viroses (SAAVEDRA *et al.*, 1994; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1999); redução dos níveis de colesterol (RASIC *et al.*, 1992), efeitos inibitórios sobre tumores (REDDY e RIVENSON, 1993); ativação e regulação do sistema imune (YASUI e OHWAKI, 1991) e a produção de vitaminas (DEGUCHI *et al.*, 1985).

Por outro lado, VRESE *et al.* (2001) enumeraram vários estudos com probióticos e intolerância à lactose, incluindo cepas de *L. acidophilus* e *B. longum*. Eles concluíram que os probióticos apresentam pouca ação sobre a fermentação da lactose, se comparados aos microrganismos utilizados como *starter* (por exemplo, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* ssp. *bulgaricus*).

Há registros de que a cepa *B. longum* BB536 melhora a microbiota intestinal (BALLONGUE *et al.*, 1993). Estudos com animais demonstram que a mesma cepa pode estar implicada na ativação do sistema imune (YAMASAKI *et al.*, 1991), na inibição do câncer (REDDY e RIVENSON, 1993) e no aumento da absorção de cálcio (IGARASHI *et al.*, 1994). MITSUOKA (1996) observou que a administração oral de 10^9 células de *B. longum* por dia, durante cinco semanas, para cinco voluntários saudáveis com idades de 25 a 35 anos, resultou no aumento das populações de bifidobactérias e decréscimo das populações de clostrídios nas fezes.

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

1.2.2. Produtos alimentícios contendo probióticos

Cepas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido incorporadas em vários produtos alimentícios nos últimos 5 anos, incluindo produtos de leite fermentado (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2003; GUEIMONDE *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2005; AKALIN *et al.*, 2005), sorvete (ALAMPRESE *et al.*, 2002), sobremesas (HEENAN *et al.*, 2004; HELLAND *et al.*, 2004; ARAGÓN-ALEGRO *et al.*, 2006), leite de soja fermentado (TSANGALIS e SHAH, 2004), produtos à base de aveia (MÅRTENSSON *et al.*, 2002), salsichas (JAHREIS *et al.*, 2002; PENNACHIA *et al.*, 2006), queijo (VINDEROLA *et al.*, 2000; BREARTY *et al.* 2001; GARDINER *et al.*, 2002; MEDICI *et al.*, 2004; BOYLSTON *et al.*, 2004; BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b; DARUKARADHYA *et al.*, 2006) e produtos à base de queijo (THARMARAJ E SHAH, 2004).

Produtos lácteos são considerados, por muitos consumidores, como a perfeita plataforma de saúde: contribuem para a sensação de ser ativo e energético; estão relacionados à digestão adequada; podem ser benéficos à saúde dos ossos, devido à presença de cálcio altamente disponível e podem auxiliar o sistema imunológico humano. Combinados com bactérias probióticas, propostas atrativas para o mercado de alimentos saudáveis têm sido desenvolvidas com sucesso (KIP *et al.*, 2005).

JURKIEWICZ (1999) relatou que o alimento probiótico deve ser de consumo popular e diário, para que os efeitos benéficos ocorram e que, portanto, há grande

variedade de produtos lácteos que podem conter bactérias probióticas. A boa aceitação pelos consumidores só ocorrerá se houver divulgação das propriedades benéficas à saúde proporcionadas por esses produtos. A autora salientou que, para que o alimento probiótico seja benéfico à saúde, a concentração da cultura probiótica no produto comercializado deve ser, no mínimo, 10^6 a 10^7 ufc mL⁻¹ ou g no final de sua vida de prateleira.

A combinação de *B. longum* e *Streptococcus thermophilus* tem apresentado altas taxas de sobrevivência em produtos ácidos. *B. bifidum* e *B. longum* são empregados como culturas mistas em combinação com *Streptococcus salivarius* e/ou *Lactobacillus acidophilus* em vários produtos lácteos apresentados no artigo de revisão de ARUNACHALAM (1999).

Produtos fermentados de leite contendo *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. têm sido desenvolvidos e há crescente interesse em outros produtos lácteos contendo espécies bacterianas com potencial benefício à saúde. Entretanto, elas apresentam multiplicação lenta em leite, o que traz dificuldades à expansão do mercado de produtos probióticos. Isso se deve à falta de atividade proteolítica, e busca-se encontrar cepas com maior atividade proteolítica, além da adição concomitante de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, para a redução no tempo de fermentação em iogurtes (SHIHATA e SHAH, 2000).

OLIVEIRA *et al.* (2001) desenvolveram leite fermentado adicionado de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, para aplicação na fabricação de bebidas lácteas probióticas. DAVIDSON *et al.* (2000) desenvolveram iogurte congelado probiótico com baixo teor de gordura, contendo *B. longum* e *L. acidophilus*, e que demonstrou ser excelente veículo para a incorporação dos probióticos, com manutenção de populações suficientes (acima de $6,5 \log$ ufc mL⁻¹), para oferecer efeitos benéficos durante 11 semanas de armazenamento.

DAIGLE *et al.* (1999) apresentaram um estudo com queijo semelhante ao Cheddar produzido com leite microfiltrado, padronizado e enriquecido com retentado de fosfocaseinato e fermentado com *Bifidobacterium infantis* (concentração inicial de 10^7 e 10^8 ufc g⁻¹ de creme). As populações estiveram acima de 10^6 ufc g⁻¹ durante, pelo menos, 12 semanas e não foram observados efeitos sobre as características organolépticas dos queijos.

GOMES e MALCATA (1998) relataram que o processamento de queijo de leite de cabra com adição das culturas probióticas *Bifidobacterium lactis* e

Lactobacillus acidophilus pode ser empregado para a obtenção de um queijo com boas características de sabor e textura. Os autores observaram que a sobrevivência das cepas probióticas mostrou-se dependente das características físico-químicas do queijo, mas que as populações finais desses microrganismos revelaram-se acima do limiar aceitável para efeito probiótico (10^6 ufc g⁻¹).

VINDEROLA *et al.* (2000) relataram que cepas de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, *B. bifidum*, *B. longum* e *L. casei* apresentaram boa manutenção da viabilidade em queijo fresco argentino, produzido com leite ultrafiltrado e com a adição de bactérias lácticas *starter* durante seu processamento.

A viabilidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* diminui marcadamente durante o armazenamento refrigerado de produtos de leite fermentado, particularmente devido ao baixo pH desses produtos (CHARTERIS *et al.*, 1998). Mas bactérias do gênero *Lactobacillus* sobrevivem melhor às condições de baixo pH e teores de oxigênio, quando comparadas às bifidobactérias. Algumas cepas de bifidobactérias podem produzir mais de 0,4g de ácido acético por litro, o que pode influenciar adversamente no sabor do produto. É relatado que esta produção de ácido acético pelas bifidobactérias pode estimular a multiplicação populacional do *L. acidophilus* (SVENSSON, 1999).

No trato gastrointestinal, por sua vez, os efeitos da presença de bifidobactéria são dependentes da sua viabilidade e atividade metabólica, sendo potencializados pela presença de carboidratos complexos e de fatores bifidogênicos denominados prebióticos (JELEN e LUTZ, 1998).

Além de boa viabilidade no intestino, as propriedades tecnológicas são pré-requisitos para a utilização potencial de culturas probióticas em queijos (KASK *et al.*, 2003).

Os queijos frescos servem como veículo apropriado para bactérias probióticas devido ao seu processo de fabricação. Uma das razões é a ausência da etapa de maturação, o que pode permitir uma maior manutenção da viabilidade dos probióticos (HELLER *et al.*, 2003). Os queijos, por apresentarem um teor relativamente alto de gordura, ainda oferecem proteção para a bactéria probiótica durante a passagem pelo trato gastrointestinal (GARDINER *et al.*, 1998). A incorporação de culturas probióticas ao queijo *quark* resfriado tem sido citada como uma alternativa interessante para a manutenção da viabilidade dos probióticos, devido à lenta passagem do *quark* pelo intestino, contribuindo para o processo de colonização (VAN DENDER, 2001).

Em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o queijo Minas frescal mostrou-se um veículo apropriado para o emprego de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, e *Streptococcus thermophilus* em co-cultura (OKAZAKI *et al.*, 2001; BURITI *et al.*, 2001), *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* individualmente e em co-cultura (ALEGRO *et al.*, 2002), *Lactobacillus acidophilus* (BURITI *et al.*, 2005b) e *Lactobacillus paracasei* (BURITI *et al.*, 2005a). Os referidos microrganismos probióticos revelaram populações superiores a 10^6 ufc g⁻¹ ao longo de todo o período de armazenamento dos queijos em refrigeração de 21 dias. O queijo fresco cremoso também apresentou boa viabilidade de *Lactobacillus paracasei* durante os 21 dias de armazenamento refrigerado, com populações superiores a 7 log ufc g⁻¹ (BURITI, 2005).

1.3. Prebióticos

Além da introdução de bactérias vivas ao cólon, através da suplementação dietética, outra forma de aumentar o número de bactérias benéficas, como espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, na microbiota intestinal, é o uso dos prebióticos.

Prebióticos foram originalmente definidos por GIBSON e ROBERFROID (1995) como 'ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimular seletivamente a multiplicação e/ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando, assim, a saúde do hospedeiro'. Mais recentemente, GIBSON *et al.* (2004) revisaram o conceito: 'um prebiótico é um ingrediente seletivamente fermentado, que permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios para a saúde e o bem-estar do hospedeiro'. Prebióticos atuam com maior frequência no intestino grosso, embora possam ter algum impacto no intestino delgado (GILLILAND, 2001).

Os ingredientes dos alimentos classificados como prebióticos geralmente exibem as seguintes características: limitada hidrólise e absorção no trato gastrointestinal superior; estimulação seletiva da multiplicação das bactérias benéficas no cólon; potencial para reprimir patógenos e limitar a virulência, através de processos, como a atenuação da virulência e imunoestimulação e estimulação da microbiota benéfica que promove a resistência à colonização por patógenos (KLAENHAMMER, 2001). Por outro lado, apesar da existência de evidências

preliminares sobre o efeito hipotrigliceridêmico desses ingredientes, o mecanismo de ação dos prebióticos sobre o metabolismo lipídico de humanos ainda não foi elucidado (PEREIRA e GIBSON, 2002).

Em recente revisão sobre os prebióticos já estabelecidos e os candidatos a prebióticos, foi relatado que evidência científica consistente quanto à eficácia prebiótica foi demonstrada apenas para a inulina, a oligofrutose (frutooligossacarídeo - FOS), os galactooligossacarídeos e a lactulose (GIBSON *et al.* 2004).

1.3.1. Frutanos como prebióticos

Cerca de 36 mil espécies vegetais apresentam frutanos como carboidratos de reserva. Dentro da classe das dicotiledôneas, os frutanos são encontrados em quase todas as espécies da família Asteraceae, muitas das quais apresentando importância econômica, como o almeirão (*Cichorium intybus*) e o tupinambo (*Helianthus tuberosus*) (CARVALHO e FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2001). Alguns exemplos de fontes vegetais naturais são: chicória, alho, banana, cebola, alho-poró, tomate, aspargo, cevada, trigo e yacon (VAN LOO *et al.*, 1995; ROBERFROID, 2002b).

Frutanos são carboidratos nos quais a maior parte das ligações glicosídicas são feitas por ligações frutossil-frutose, geralmente com uma unidade de glicose terminal (Figura 1) (ROCHA *et al.*, 2006).

Figura 1. Frutano tipo inulina

Há vários estudos que apresentam evidências da resistência dos frutanos à digestão no intestino delgado (ELLEGÅRD *et al.*, 1997, CUMMINGS *et al.*, 2001; CHERBUT, 2002). Atravessando intactos o intestino delgado, os frutanos passam a contribuir com os substratos fermentáveis para a microbiota do intestino grosso, juntamente com outros carboidratos fermentáveis (amidos e oligossacarídeos resistentes, polissacarídeos diferentes do amido), com proteínas e com material endógeno (mucinas, células esfoliadas). No intestino grosso normal existem cerca de 1500 g de bactérias em concentrações que atingem de 10^{11} a 10^{12} microrganismos por grama de fezes, sendo mais de 400 espécies de bactérias, com predomínio dos microrganismos anaeróbios sobre os aeróbios, da ordem de 1000 para 1 (CUMMINGS *et al.*, 1997).

Embora existam diferenças consideráveis entre indivíduos, em cada um a composição da microbiota intestinal é estável por longo tempo. Não é a mesma nos diferentes segmentos do intestino grosso. Há, também, diferenças entre a microbiota da luz e a que está em íntimo contato com a mucosa (KLEESSEN *et al.*, 2003; Le BLAY *et al.*, 2003).

O processo fermentativo envolve a interação entre as diferentes espécies de bactérias presentes no intestino grosso. O ecossistema bacteriano é extremamente complexo, com os resíduos de uma espécie microbiana servindo de substrato para outra, de forma sinérgica (CUMMINGS *et al.*, 1997; CUMMINGS e MacFARLANE, 2002).

Os frutanos são considerados prebióticos, por serem seletivamente fermentados pelas bactérias colônicas. Bactérias alimentadas por um substrato preferencial têm vantagem proliferativa, em relação a outras bactérias. A fermentabilidade e o efeito bifidogênico dos frutanos foram confirmados *in vitro* e *in vivo*, conforme citam WALKER e DUFFY (1998), em seu artigo de revisão. Segundo os autores, os resultados mostraram que há um aumento nos ácidos graxos de cadeia curta, um abaixamento no pH e a proliferação de espécies de *Bifidobacterium* no cólon e nas fezes.

Os frutanos podem ser adicionados aos alimentos, para promoverem a multiplicação de bifidobactérias. Uma vez estimuladas, as bifidobactérias previnem a constipação, por estimularem o peristaltismo intestinal e aumentarem a umidade das fezes (DeFELICE, 1995; NINESS, 1999). MENNE *et al.* (2000) confirmaram o efeito de aumento do volume nas fezes, com a ingestão de oito gramas de oligofrutose por

dia. Os autores relataram, ainda, mudanças na frequência das evacuações e na aparência das fezes (mais amolecidas).

A maioria dos prebióticos são metabolizados no cólon proximal, fazendo deste uma região sacarolítica para a microbiota. Em contraste, o cólon distal é muito mais proteolítico, com níveis relativamente altos de pró-carcinógenos e toxinas. Muitas propriedades desejáveis dos prebióticos estão relacionadas com a sua capacidade em induzir o metabolismo sacarolítico durante a passagem pelo cólon. Isto pode ser alcançado pelo emprego de prebióticos contendo uma mistura de moléculas com pesos moleculares adequados. As moléculas de baixo peso molecular serão metabolizadas no cólon proximal (lado direito), e as de alto peso molecular serão metabolizadas mais lentamente, atingindo o cólon distal (lado esquerdo) (RASTALL *et al.*, 2000).

Existem muitos estudos mostrando os efeitos da ingestão de prebióticos associados à saúde como: redução do risco de câncer de cólon e do nível de colesterol e lipídios no sangue, prevenção de infecções no trato gastrointestinal e aumento na biodisponibilidade de minerais. Os prebióticos afetam indiretamente o metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de minerais e atuam na modulação do sistema imune (ROBERFROID e DELZENNE, 1998; TAHIRI *et al.*, 2001; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001; BOECKENER *et al.*, 2001; FLAMM *et al.*, 2001; SCHLEY e FIELD, 2002; SCHOLZ-AHRENS e SCHREZENMEIER, 2002; DELZENNE *et al.*, 2002; LOBO e FILISETTI, 2003a; LOBO e FILISETTI, 2003b). Porém, os efeitos já demonstrados em humanos foram o alívio da constipação intestinal e o tratamento da encefalopatia hepática (MARTEAU e BOUTRON-RUAULT, 2002).

Observou-se que carboidratos pouco digeríveis e de baixo peso molecular exibem efeitos positivos no trânsito intestinal em pacientes com constipação. Isto é devido, provavelmente, não só ao seu efeito osmótico, mas também a outros mecanismos, incluindo-se a modulação da microbiota nativa (MARTEAU e BOUTRON-RUAULT, 2002).

Há algumas evidências experimentais mostrando que sais biliares secundários presentes nas fezes estão envolvidos na carcinogênese colônica, e que os oligossacarídeos não digeríveis são responsáveis pela sua diminuição, provavelmente através da redução do pH colônico. Muitos estudos em animais sustentam essa hipótese e sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos (POOL-ZOBEL *et al.*, 2002).

1.3.1.1. Inulina e oligofrutose

Frutooligossacarídeos (FOS) e frutanos do tipo inulina têm sido os prebióticos mais pesquisados (FOOKS *et al.*, 1999; GILLILAND, 2001; ROBERFROID, 2005). Inulina e FOS são polímeros lineares de frutoses unidas por ligações do tipo β -(2 $\rightarrow$ 1) de diferentes graus de polimerização (ROCHA *et al.*, 2006). Os polímeros purificados geralmente têm um *flavour* pouco pronunciado e nenhum *aftertaste*, embora os FOS de cadeia curta apresentem alguma doçura (DEVEREUX *et al.*, 2003).

As raízes de chicória são utilizadas industrialmente para a extração dos frutanos inulina e oligofrutose. Estima-se que o consumo diário médio de frutanos esteja entre 1 e 4 g nos EUA (MOSHFEGH *et al.*, 1999) e entre 3 e 11 g na Europa (VAN LOO *et al.*, 1995).

A oligofrutose e a inulina são resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato digestivo humano devido à sua configuração e são classificadas como 'oligossacarídeos não digeríveis', pois são praticamente indigeríveis no intestino delgado humano (ROBERFROID, 2000a). Os efeitos da inulina e da oligofrutose sobre a microbiota humana têm sido amplamente estudados *in vivo* e *in vitro*, e a maioria dos estudos relatam uma fermentação seletiva pela microbiota bacteriana, principalmente as bifidobactérias e, em menor extensão, os *Lactobacillus* (KOLIDA, 2002).

Inulina e oligofrutose são oficialmente reconhecidas como ingredientes alimentícios naturais e são classificados como fibra alimentar em quase todos os países europeus (ROBERFROID, 2000a).

A fermentação dos frutooligossacarídeos da chicória (inulina e oligofrutose) é acompanhada por uma mudança significativa na composição da microbiota colônica devido à proliferação seletiva de bifidobactérias e uma concomitante redução no número de outras bactérias como bacteróides, fusobactérias ou clostrídios (ROBERFROID, 2000a). Esses ingredientes são freqüentemente utilizados em combinação com probióticos, adicionados à alimentação do hospedeiro para promover a saúde, aumentando a sobrevivência, multiplicação e implantação desses microrganismos (NINESS, 1999).

Alguns estudos mostraram que FOS foi altamente efetivo quando incorporado em biscoito (6,6g dia⁻¹) (TUOHY *et al.*, 2001a) e inulina HP (fração de alto peso

molecular da inulina derivada da chicória), consumida na quantidade de 8g dia⁻¹, levou a um aumento nas bifidobactérias nas fezes dos voluntários (TUOHY *et al.*, 2001b).

Resultados de estudos com humanos mostraram mudanças significativas na composição da microbiota fecal humana. Tais resultados levaram à conclusão de que oligossacarídeos de chicória (de 3 a 15 g dia⁻¹, por algumas semanas) são prebióticos (ROBERFROID *et al.*, 1998, GIBSON, 1999, RAO, 1999). NINESS (1999) também relatou alterações positivas na microbiota intestinal, demonstradas em estudos *in vivo* em humanos, com doses entre 5 e 20g por dia de inulina e/ou oligofrutose, durante um período de 15 dias de administração. De acordo com ROBERFROID (1999), doses de 4 a 5 g por dia são eficientes para o estímulo da multiplicação das bifidobactérias.

KAUR e GUPTA (2002) relataram, em sua revisão, algumas possíveis aplicações fisiológicas e nutricionais da inulina e FOS, além do efeito prebiótico: aumento na absorção de cálcio pelo organismo, redução do conteúdo de triglicérides no sangue e no fígado, redução da constipação, influência na glicemia/insulinemia, na colesterolemia, na uremia e na excreção de nitrogênio/uréia, no câncer de cólon e de mamas.

A inulina e a oligofrutose possuem valor calórico baixo, pois as ligações $\beta(2\rightarrow1)$ que unem as moléculas de frutose não são hidrolisadas pelas enzimas digestivas de humanos. Muitos estudos indicam que quase toda inulina e oligofrutose ingeridas entram no cólon, sendo fermentadas pela microbiota colônica, e a energia liberada resulta, em grande parte, da produção de ácidos graxos de cadeia curta e lactato que, ao serem metabolizados, contribuem com aproximadamente 1,5 Kcal/g de energia livre. Outros produtos da fermentação, incluindo a biomassa bacteriana e gases, são eventualmente excretados (NINESS, 1999). A fermentação da inulina e da oligofrutose pode causar um ligeiro aumento no volume e algum aumento no peso seco do conteúdo intestinal do intestino delgado, podendo aumentar o peso fecal, através do aumento da microbiota do cólon (SCHNEEMAN, 1999).

Alguns efeitos colaterais indejáveis podem resultar da ingestão de frutooligossacarídeos, como flatulência e desarranjos intestinais (RASTALL, 2002; NYMAN, 2002). Dosagens de 20 a 40g por dia de inulina administrada para idosos com constipação levaram a um efeito laxativo (VAN DOKKUN *et al.*, 1999).

1.3.1.1.1. Inulina e oligofrutose – aplicações em alimentos

Além dos benefícios nutricionais, a inulina é usada como ingrediente na formulação de novos alimentos por razões tecnológicas. É usada como substituta de açúcar ou de gordura ou como agente pouco calórico ou, ainda, como agente melhorador de textura (TUNGLAND e MEYER, 2002). Suas propriedades de mimetizador de gordura têm sido atribuídas à sua capacidade de se ligar a moléculas de água e formar um rede de gel, aumentando a cremosidade de alguns alimentos. Também auxilia na retenção de água, para evitar a formação de cristais de gelo (FRANCK, 2002).

A inulina pode ser utilizada em laticínios (iogurtes, sobremesas lácteas, sorvetes e produtos à base de queijo), em produtos de confeitaria (pães e biscoitos), bebidas e cereais matinais (MEYER e TUNGLAND, 2001), em produtos espalháveis com redução de gordura, em sobremesas congeladas e em molhos (KAUR *et al.*, 2002).

A oligofrutose, composta de oligômeros de cadeia curta, possui propriedades funcionais similares ao açúcar ou aos xaropes de glicose. Contribui para o corpo de produtos lácteos e para a humectância para produtos de panificação macios, reduz o ponto de congelamento em sobremesas congeladas, fornece crocância para biscoitos com baixo teor de gordura e atua como agente ligante em barras de cereais e grãos, da mesma forma que o açúcar, mas com benefícios adicionais de baixo poder calórico e enriquecimento em fibras (KAUR *et al.*, 2002).

A utilização da inulina e da oligofrutose resulta, muitas vezes, na melhora das características sensoriais do produto, principalmente textura e sabor. No caso de salgadinhos e cereais matinais, a aplicação da inulina e da oligofrutose resulta em maior crocância e expansão do produto, aumentando sua vida de prateleira. Para pães e bolos, a aplicação da inulina e da oligofrutose mantém a umidade e a característica de produto fresco por mais tempo (FRANCK, 2002).

A característica gelificante da inulina permite o desenvolvimento de alimentos com baixo teor de gordura, sem comprometer o seu sabor ou a sua textura. Para produtos lácteos com baixo teor de gordura, como bebidas lácteas, queijos frescos, iogurtes, cremes e sobremesas lácteas, a aplicação de pequena quantidade de inulina resulta em sabor e cremosidade mais equilibrados (FRANCK, 2002).

A aplicação da inulina em musses de chocolate e frutas, iogurte ou produtos à base de queijos frescos melhora o processo tecnológico, aumentando a qualidade do produto e mantendo suas características por mais tempo. A aplicação da oligofrutose (1 a 3%) em produtos lácteos dietéticos e *light*, como iogurtes de frutas, melhora a sensação residual na boca, reduzindo também a sinérese (FRANCK, 2002).

Vários estudos relataram o efeito da adição de inulina em produtos lácteos: mudanças na viscosidade e aceitação de iogurte (DELLO STAFFOLO *et al.*, 2004); melhora na textura e sabor em iogurte com baixo teor de gordura (SPIEGEL *et al.*, 1994); melhora da sensação na boca em iogurtes tradicionais (ROBINSON, 1995); aumento na viscosidade (EL-NAGAR *et al.*, 2002) e melhora nas propriedades sensoriais de sorvete com baixo teor de gordura (SCHALLER-POVOLNY e SMITH, 1999), melhora nas propriedades sensoriais, de textura e de derretimento de queijos com baixo teor de gordura (KOCA e METIN, 2004).

1.3.2. Oligossacarídeos do mel como prebióticos

O mel produzido por abelhas tem como principais carboidratos a frutose e a glucose, mas além desses carboidratos, o mel possui um teor menor de dissacarídeos e trissacarídeos, contendo resíduos de glucose e frutose (oligossacarídeos) (LEITE *et al.*, 2000). O mel é um xarope natural contendo frutose (38,5%) e glucose (31,3%). Outros açúcares presentes são maltose (7,2%), sacarose (1,5%), e vários oligossacarídeos (4,2%). Ele também contém vários ácidos orgânicos (0,17 a 1,17%) (NATIONAL HONEY BOARD, 1996).

CHICK *et al.* (2001) estudaram a adição de 5% de mel, frutose ou sacarose ao leite desnatado e inoculado com *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* ou *Bifidobacterium bifidum*. O mel permitiu a multiplicação dos quatro microrganismos de forma semelhante aos outros açúcares e não foi inibitório. Segundo os autores, vários oligossacarídeos encontrados no mel podem ser responsáveis por essa multiplicação.

Outro trabalho comparando a multiplicação de *Bifidobacterium bifidum* em leite desnatado reconstituído, na presença de 5% de mel, sacarose, frutose ou glicose, mostrou que a promoção da multiplicação e a retenção da viabilidade das bifidobactérias, aos 14 dias de armazenamento sob refrigeração, foi maior na

presença de mel, em relação aos outros açúcares (USTUNOL e GANDHI, 2001). Os autores consideraram, ainda, que os oligossacarídeos de baixo grau de polimerização presentes no mel podem ser substratos mais favoráveis à multiplicação das bifidobactérias, apesar de não terem descartado um efeito sinérgico dos carboidratos presentes no mel.

KAJIWARA *et al.* (2002) consideraram que, além dos oligossacarídeos presentes e que podem atuar como agentes prebióticos, o mel também suprime bactérias potencialmente deletérias da microbiota do trato gastrointestinal. Nesse sentido, SHAMALA *et al.* (2000) também enfatizaram que o mel possui substâncias antibacterianas que podem beneficiar o organismo, dentre elas flavonóides, substâncias ácidas aromáticas e peróxido de hidrogênio, além de apresentarem alta osmolaridade.

Um trabalho comparando a multiplicação de cinco espécies de bifidobactérias intestinais humanas, em meio de cultura suplementado com 5% de mel, frutooligossacarídeo (FOS), galactooligossacarídeo (GOS) e inulina mostrou que, na presença de mel, a multiplicação de todas as culturas foi maior do que na presença dos outros prebióticos. Os autores consideram que esse comportamento pode ser devido aos oligossacarídeos presentes no mel em níveis de 4 a 5%, e que o mel poderia promover os mesmos efeitos benéficos à saúde atribuídos aos agentes prebióticos (KAJIWARA *et al.*, 2002).

1.4. Alimentos simbióticos

‘O termo simbiótico é usado quando um produto contém tanto probióticos quanto prebióticos’ (SCHREZENMEIER e VRESE, 2001; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002). O sinérgismo pode ser obtido *in vivo* pela ingestão dos probióticos e também pelo estímulo das bifidobactérias endógenas. Assim, tanto um produto com a combinação de oligofrutose e bifidobactérias quanto outro contendo oligofrutose e *Lactobacillus casei*, por exemplo, encaixam-se na definição de produto simbiótico (SCHREZENMEIER e VRESE, 2001).

COLLINS e GIBSON (1999) citaram combinações de bifidobactérias com frutooligossacarídeos, bifidobactérias com galactooligossacarídeos e lactobacilos com lactitol, como exemplos de simbióticos em avaliação.

Produtos simbióticos não têm sido, ainda, intensivamente estudados (BIELECKA *et al.*, 2002). ROBERFROID (2000b) sugeriu que produtos simbióticos podem melhorar a sobrevivência das bactérias, ao passarem pela parte superior do trato gastrointestinal e, assim, produzir maiores efeitos no intestino grosso. Além disso, segundo MATTILA-SANDHOLM *et al.* (2002), 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. Não se sabe se as contribuições individuais são aditivas ou sinérgicas, mas pode haver um aumento dos efeitos benéficos de cada um deles (BIELECKA *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com várias cepas de *Bifidobacterium* (como probiótico) e frutooligossacarídeos (como prebiótico), em combinações simbióticas confirmaram a alta efetividade da oligofrutose como bifidogênico usada *in vivo* como prebiótico e que combinações de bifidobactéria e oligofrutose em produtos simbióticos também são efetivas (BIELECKA *et al.*, 2002).

1.5. Produtos lácteos

De acordo com ACNIELSEN (2004), o mercado de produtos lácteos global, envolvendo 59 países, cresceu 4% de 2003 para 2004. O mercado de queijos, no mesmo período, aumentou 5%, o que representa cerca de € 1,6 bilhões de incremento. Esse aumento pode estar associado às dietas ricas em proteína e pobres em carboidratos, as quais permitem o consumo livre de queijos.

1.5.1. Queijo quark

Queijo *quark* ou *quarg* é um queijo obtido por precipitação ácida de leite bovino integral ou desnatado (adição de cultura *starter* mesófila e renina), originário do leste e centro da Europa (JELEN e RENZ-SCHAUEN, 1989). Tradicionalmente, quando o pH atinge 4,6 forma-se uma coalhada ácida que é, então, separada do soro, por drenagem em sacos de pano ou por centrifugação (KOSIKOWSKI, 1978; KROGER, 1980).

O queijo quark é uma massa branca desnatada, macia e pastosa, não maturada, com sabor levemente ácido, que pode ser utilizada para a fabricação de

diversos tipos de queijos, dependendo dos ingredientes que forem adicionados. Por exemplo, pode-se adicionar sal e condimentos (*bacon*, azeitona, salsa, etc.), para a produção de queijos condimentados, ou açúcar e base de frutas, para produção de queijo *petit-suisse* (MORGADO e BRANDÃO, 1998).

Queijos frescos como o quark eram inicialmente produzidos em propriedades rurais, passando a ser produzidos industrialmente a partir da década de 1950. A obtenção industrial deste tipo de queijo era feita, inicialmente, com a utilização de tanques de prensagem direta da massa e, posteriormente, de centrífugas para a separação do soro (VAN DENDER *et al.*, 1985). Mais recentemente, também vem sendo utilizada a ultrafiltração (MORGADO e BRANDÃO, 1998).

O processamento tradicional de quark está descrito em VAN DENDER *et al.* (1985) e em MORGADO e BRANDÃO (1992a) e envolve as seguintes etapas: pasteurização de leite desnatado (72°C por 15s); resfriamento até 22-23°C; adição de fermento láctico mesofílico (tipo O) a 5%; incubação por 5 horas até pH 6,3; adição de 0,001 a 0,002 % de renina; corte em cubos, ao atingir pH 5,5; dessoramento em sacos de pano por 8 horas ou até atingir extrato seco total de 18% e pH final de 4,6 a 4,7. Uma variação no processo envolve a dessoragem por centrifugação da coalhada.

O rendimento médio da produção de massa branca pelo processo de centrifugação é de cerca de 4,62 litros de leite por Kg de queijo *quark* (MORGADO e BRANDÃO, 1998). A utilização da ultrafiltração pode ser importante para a redução nos custos de processamento do quark, pois as proteínas do soro podem ser transferidas ao produto final, havendo um aumento no rendimento de fabricação e na qualidade nutricional, pois a relação caseína / proteínas do soro corresponde à encontrada no leite (4:1) (VEIGA, 1999).

Num dos poucos trabalhos recentes com queijo *quark*, KELLY e O'DONNELL (1998) produziram queijo quark com alterações nos parâmetros de processamento (tratamento térmico do leite a 72°C/15s ou 90°C/10min) e qualidade do leite (adição de KIO₃ e plasmina) e estudaram sua composição, propriedades de gel e microestrutura. A plasmina afetou a microestrutura, as propriedades reológicas e aumentou a umidade do queijo. O aumento na temperatura de tratamento térmico do leite provocou um aumento na umidade, tornou a microestrutura mais aberta e a textura menos firme.

A vida de prateleira do quark é limitada pela proteólise, que causa amargor, e pela excessiva produção de ácido. A contaminação por bolores e leveduras pode

reduzir a manutenção da qualidade. A conservação em temperatura elevada provoca a deterioração do *flavour* e a expulsão de soro precocemente (WALSTRA *et al.*, 1999). Ensaio envolvendo a avaliação microbiológica demonstraram que a determinação de coliformes é importante, do ponto de vista de higiene para o produto fresco, ao passo que o nível de contaminação por bolores e leveduras mostrou ser o critério microbiológico mais importante para avaliar a deterioração e a durabilidade do *quark* (VAN DENDER, 2001).

1.5.2. Queijo *petit-suisse*

O queijo *petit-suisse* foi primeiramente desenvolvido por Charles Chervais em 1850, adicionando creme de leite ao queijo quark desnatado, obtido a partir de coagulação mista. Possui consistência cremosa e pode ser adicionado de ingredientes doces ou salgados (SANDRAZ, 1989). Adiciona-se fermento até que a acidez desejável seja atingida. Após a drenagem do soro, a massa concentrada, apresentando extrato seco total em torno de 16%, é resfriada. A adição de açúcar comumente é feita nas mesmas proporções da quantidade de gordura do creme a ser padronizado (ALBUQUERQUE, 1986).

A produção de queijo *petit-suisse* é tradicionalmente realizada nas indústrias de laticínios pelo método da centrifugação da coalhada ácida, obtendo-se a massa básica, conhecida como queijo *quark*. Esta é posteriormente adicionada de sabor, embalada e comercializada sob refrigeração como queijo *petit-suisse*. Com o processo de ultrafiltração, o processo de fabricação do *petit-suisse* está se tornando mais rápido e com rendimento industrial aumentado (MORGADO e BRANDÃO, 1992a).

Conforme relatado por MORGADO e BRANDÃO (1992b,c), a fabricação de queijo *petit-suisse* pelo método da ultrafiltração do leite padronizado, parcialmente acidificado, possibilita a obtenção de produto com características físico-químicas semelhantes às do produto fabricado pelo método tradicional de centrifugação da coalhada ácida. VEIGA (1999) desenvolveu queijo *petit-suisse* por ultrafiltração e obteve um produto com boa aceitação pelo consumidor.

O queijo *petit-suisse* é um queijo de altíssima umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo *Petit-Suisse* (BRASIL, 2002). Quando em sua

elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, até o máximo de 30% m/m, classifica-se como queijo *petit-suisse* com adições. No caso em que os ingredientes opcionais sejam exclusivamente açúcares e/ou se adicionam substâncias aromatizantes/saborizantes, classifica-se como queijo *petit-suisse* com açúcar e/ou aromatizados/saborizados. O queijo *petit-suisse* deve ser envasado em materiais adequados às condições de armazenamento previstas, de forma a conferir ao produto uma proteção adequada, e deve ser conservado e comercializado à temperatura não superior a 10°C. O queijo *petit-suisse* deve cumprir o estabelecido no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, para queijos de muito alta umidade com bactérias lácteas abundantes e viáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2001).

O produto é consumido como sobremesa, dirigido principalmente ao público infantil. Entretanto, VEIGA *et al.* (2000) já utilizaram consumidores adultos para permitir uma melhor avaliação da aceitação da consistência e para investigar o potencial consumidor de uma faixa etária diferente. O produto tem boa aceitação, mas o consumo ainda é pequeno, quando comparado ao de outros países, provavelmente em função do preço e do uso restrito como sobremesa infantil (VEIGA, 1999). A produção anual brasileira de queijo *petit-suisse* aumentou de 14.000 toneladas em 1991 para 22.932 toneladas em 2004 e foi estimada em 24.000 toneladas para o ano de 2005 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2004).

Os queijos *petit-suisse* nacionais são adicionados de hidrocolóides, que interagem com as proteínas do leite, podendo resultar em alterações na estabilidade e consistência do produto final (GLICKSMAN, 1986; SCHMIDT e SMITH, 1992). Em geral, o queijo *petit-suisse* possui uma consistência semelhante à do queijo quark, apresentando comportamento de material sólido (elástico) e líquido (viscoso) (OMAR, 1995). Materiais que mostram essas características são considerados viscoelásticos e a determinação do seu comportamento reológico é importante em avaliações de consistência e estabilidade, fornecendo também informações sobre a estrutura do produto (SHOEMAKER *et al.*, 1992).

Há poucos trabalhos sobre queijo *petit-suisse* e as características do produto brasileiro em literatura recente.

1.5.3. Emprego de culturas lácticas em queijos

As culturas lácticas são utilizadas na fabricação de queijos para repor parte das bactérias lácticas eliminadas durante o processo de pasteurização do leite. São denominadas culturas *starter* ou fermentos lácticos. A multiplicação dos fermentos resulta na conversão de lactose em ácido láctico, o que irá garantir um pH adequado para a coagulação através da renina do coalho. A adição das culturas *starter* influenciam o pH final da coalhada, o conteúdo de umidade do queijo e suas características sensoriais e de textura durante a maturação (HOIER *et al.*, 1999).

As culturas lácticas empregadas na produção de queijo constituem-se em culturas mesofílicas e termofílicas, com temperaturas ótimas de multiplicação de cerca de 30°C e de 45°C, respectivamente. As culturas termofílicas são compostas, basicamente, de culturas isoladas de *Streptococcus thermophilus* ou associadas a diversas espécies de *Lactobacillus*. As culturas mesofílicas são classificadas em dois tipos: LD, caracterizada pela produção de aroma e CO₂ a partir do citrato, e O, pela produção de ácido, não acompanhada da produção de gás (HOIER *et al.*, 1999).

Além de exercerem uma influência considerável sobre as características físico-químicas e sensoriais dos queijos, as bactérias lácticas são úteis por possuírem atividade inibitória sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes (SHAH, 2000).

1.5.3.1. *Streptococcus thermophilus*

Algumas espécies de *Streptococcus* compreendem microrganismos patogênicos letais para o ser humano, como, por exemplo, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. agalactiae*. Entretanto, *S. thermophilus* é uma espécie considerada *generally recognised as safe* (GRAS), sendo que anualmente são ingeridas acima de 10²¹ células vivas desse microrganismo pela população humana (HOLS *et al.*, 2005).

Atualmente, são conhecidas 39 espécies de *Streptococcus*, das quais somente a espécie *Streptococcus thermophilus* é utilizada como cultura *starter*. O termo *starter* é empregado devido ao fato destas bactérias iniciarem a produção de ácido no meio em que estão inseridas. A partir da fermentação da lactose, as culturas de *Streptococcus thermophilus* produzem substâncias como o ácido

fórmico, ácido láctico e, em pequenas quantidades, CO₂ (FOX *et al.*, 2000, ZISU e SHAH, 2003).

Por ser extensivamente utilizada na elaboração de produtos lácteos, a cultura de *S. thermophilus* é de grande importância para a indústria alimentícia e é considerada a segunda cultura *starter* de uso mais importante depois de *Lactococcus lactis* (HOLS *et al.*, 2005). As culturas de *Streptococcus thermophilus* são comumente aplicadas na fabricação de diversos produtos lácteos, como iogurtes, queijos tipo emmental, queijos suíços e queijos tipo italiano, para facilitar o processo de fermentação (HUSSON-KAO *et al.*, 2000). Além disso, são empregadas diretamente ou em co-cultura com *Lactobacillus*, na produção de mussarela e queijo cheddar (HOLS *et al.*, 2005). A adição de culturas *starter* em produtos probióticos é aconselhável, em função da perda da viabilidade da bactéria probiótica (FOX *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A adição de culturas a produtos lácteos pode conferir alterações de sabor e textura aos mesmos, devido à autólise bacteriana. Quando ocorre nas células de culturas *starter*, a autólise parece ser uma maneira promissora para melhorar o sabor de produtos lácteos onde elas estão inseridas. Células de *Streptococcus thermophilus* sofrem autólise extensivamente ao longo da sua multiplicação (HUSSON-KAO, 2000). SHAH (2000) esclarece que culturas *starter*, assim como culturas probióticas, influenciam as características físico-químicas e sensoriais dos queijos. Uma das modificações que essas culturas podem causar nos queijos é a quebra das proteínas (proteólise), resultando em modificações na matriz dos queijos (SOUSA *et al.*, 2001).

Muitas cepas de *S. thermophilus* sintetizam polissacarídeos extracelulares. A produção destes polissacarídeos durante a fermentação do leite melhora a textura viscosa do produto fermentado, contribuindo para a percepção do sabor e da textura, tipicamente associados com determinados produtos lácteos fermentados. Além disso, a produção de polissacarídeos extracelulares pode contribuir na manutenção de propriedades de textura (SEBASTIANI e ZELGER, 1998) e evitar a sinérese em produtos com níveis reduzidos de gordura, como iogurte, *sour cream* ou queijos (HOLS *et al.*, 2005).

Recentemente, pesquisas têm apontado *S. thermophilus* como sendo uma cepa probiótica, em virtude do seu efeito de liberação de lactase no intestino delgado, efeito este reconhecido como uma atividade probiótica, embora *S.*

thermophilus não sobreviva ao trânsito intestinal (REID *et al.*, 2003; SANDERS, 2003). Em contrapartida, DROUAULT *et al.* (2002) e MATER *et al.* (2005) esclarecem que *S. thermophilus* é capaz de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal. Embora *S. thermophilus* recentemente seja classificado como uma cultura probiótica, não possui outras características desejáveis para uma cepa probiótica, como por exemplo, possuir origem na microbiota intestinal humana sadia (SHAH, 2000).

1.5.4. Textura em queijos

Figura 2. (a) Texturômetro – TA-XT2 empregado para medir o perfil de textura instrumental; (b) curva típica obtida para teste com dupla compressão.

A reologia envolve o estudo da deformação e fluxo de materiais quando submetidos a uma tensão ou compressão (FOX *et al.*, 2000). Medidas reológicas são particularmente adequadas para investigar a estrutura do queijo e estão intimamente relacionadas com a composição e o valor de pH (GONZALEZ *et al.*, 1998).

Entretanto, alguns fatores podem influenciar o comportamento reológico do alimento, e os equipamentos utilizados para realizar medidas reológicas devem ser adaptados o máximo possível a fim de evitar tal influência e poder 'imitar' melhor a análise sensorial. Citam-se a temperatura, a ação da saliva como lubrificante, a velocidade do movimento de mastigação e da língua dentro da boca, dentre outros (ROSENTHAL, 1999).

A textura é considerada um dos quatro fatores de qualidade dos produtos

alimentícios, sendo os outros três o aroma, a aparência e o valor nutricional (MESSENS *et al.*, 2000).

A textura é uma característica mensurável de maneira direta somente através de análise sensorial. Obtêm-se, assim, características visuais, de toque e de degustação (contato com a língua, resistência ao corte dos dentes, mastigação e deglutição) do produto alimentício. Entretanto, manter um painel treinado é caro e difícil e um método instrumental tem utilização simples, fácil de padronizar e requer pouco pessoal treinado.

Um dos testes instrumentais imitativos mais empregado é a análise do perfil de textura (*texture profile analysis* - TPA) (ROSENTHAL, 1999; GUNASERAKAN e AK, 2003), baseada em força de compressão, que tem a função de simular a mastigação entre os molares. A amostra é submetida a duas compressões, que simulam melhor o ato de mastigação. O tempo recomendado em cada uma é de 5 segundos. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força de compressão é traçada. A partir dessa curva, obtêm-se valores dos parâmetros fraturabilidade, dureza (ou firmeza), coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade (FOX *et al.*, 2000).

A dureza (ou firmeza) é a força necessária para realizar uma determinada deformação; a coesividade é a resistência das ligações internas; a adesividade é o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e outras superfícies em que o alimento entra em contato; a elasticidade é a razão pela qual um material deformado volta à sua condição não deformada após remoção da força de deformação; a fraturabilidade é a força necessária para quebrar o material; a mastigabilidade é o tempo ou o número de mastigações requeridas para desintegrar um alimento sólido a um estado pronto para ser deglutido, sendo o produto da dureza, coesividade e elasticidade, e a gomosidade é a energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido a um estado pronto para ser deglutido, sendo produto de um baixo grau de dureza e alto de coesividade (SZCZESNIAK, 1998; FOX *et al.*, 2000).

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

1.6. Metodologia de superfície de resposta e otimização

O desenvolvimento de produtos alimentícios é uma atividade de alto risco. Há uma proporção de falhas extremamente alta, e menos de 1% dos projetos de novos produtos tinha sucesso no mercado consumidor em 1994 (ARTEAGA *et al.*, 1994). Assim, o rápido desenvolvimento de um novo produto apresenta vantagens competitivas. Hoje, a realidade não é muito diferente diante do crescente grau de exigência dos consumidores modernos.

Dentre as diferentes técnicas empregadas para o delineamento estatístico no desenvolvimento de novos produtos, há os tradicionais ensaios fatoriais, que demandam a realização de muitos ensaios, o que é custoso e demorado. Uma alternativa pode ser o emprego da metodologia de superfície de resposta.

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) é um conjunto de técnicas baseadas no uso de planejamento fatorial introduzido desde a década de 50 do século passado e aplicado com grande sucesso para a modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al.*, 2003). A complexidade da matemática envolvida na RSM limitou sua aplicação durante algum tempo e, devido ao aumento na disponibilidade de computadores e programas eficientes, ela se tornou acessível e útil para a otimização (GUILLOU e FLOROS, 1993).

A modelagem da RSM é baseada no uso do “método dos mínimos quadrados” ajustado para a construção de modelos empíricos simples (em geral lineares, quadráticos) que descrevem o comportamento do sistema sob estudo com base nas respostas obtidas a partir de planejamentos fatoriais ou fatoriais ampliados (BARROS NETO *et al.*, 2003).

Na RSM, o número de variáveis não é uma restrição, nem o número de respostas. Assim, a RSM pode ser aplicada a qualquer número de variáveis independentes e pode modelar simultaneamente várias respostas. Essa característica é importante em muitas situações práticas, onde vários critérios devem ser satisfeitos ao mesmo tempo (BARROS NETO *et al.*, 2003).

Um fator complicador na formulação de alimentos é a existência de limitações ou restrições (CASTRO *et al.*, 2003), que podem limitar os valores dos fatores ou das respostas, como por exemplo, limite no teor de gordura em 20% ou valor de aceitabilidade maior ou igual a 8 para determinada formulação (ARTEAGA *et al.*,

1994). Assim, a melhor formulação em determinado caso pode ser a mais barata dentro de certas restrições, enquanto que alguns parâmetros de qualidade sensorial poderiam definir a melhor formulação em outra situação (ARTEAGA *et al.*, 1994).

Na maioria das aplicações da RSM, várias respostas são medidas para cada grupo de condições experimentais e um modelo é ajustado para cada resposta (CASTRO *et al.*, 2003). A maior limitação dessa metodologia é assumir que um modelo matemático possa descrever precisamente o sistema (entenda-se como 'alimento', no caso desta pesquisa) sob estudo (ARTEAGA *et al.*, 1994).

Um exemplo de derivação da RSM é o caso de ensaios envolvendo misturas, empregadas neste trabalho de pesquisa.

Vários pesquisadores têm utilizado a RSM para a modelagem de misturas na área de tecnologia de alimentos (HOLT *et al.*, 1992; GUILLOU e FLOROS, 1993; ARTEAGA *et al.*, 1993; PASTOR *et al.*, 1996; ELLERKJÆR *et al.*, 1996; PRINYAWIWATKUL *et al.*, 1997; GUINARD *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2003; JUNQUEIRA *et al.*, 2006).

Nas misturas, os ingredientes (x_i) de um número q são considerados variáveis linearmente dependentes, isto é, $\sum_{i=1}^q x_i = 1$ (cujos valores são dependentes). Assim, as respostas para as misturas são determinadas pelas proporções mantidas entre variáveis e não pela quantidade total de cada uma (CORNELL, 2002). Essa restrição torna os ensaios com mistura diferentes dos outros ensaios fatoriais. Sua metodologia inclui uma série de etapas descritas para a RSM: seleção dos parâmetros do sistema, formulação do plano experimental, ajuste do modelo, otimização (ARTEAGA *et al.*, 1994).

O sistema de coordenadas usado para os valores de x_i ($i= 1, 2, 3, \dots, q$) é chamado de sistema de coordenadas *simplex*, e a descrição geométrica da representação espacial irá depender do número q de componentes, podendo assumir a forma de uma reta para $q= 2$, triângulo equilátero para $q= 3$ ou tetraedro para $q= 4$ (CORNELL, 2002).

Os comentários a seguir, acerca da modelagem de misturas, foram baseados na excelente obra de BARROS NETO *et al.* (2003).

Misturas ternárias são formadas por três componentes, três fatores independentes. Observa-se que os três fatores são representados por x_1 , x_2 e x_3 , que devem somar 1, ou 100%, e correspondem geometricamente a um triângulo equilátero. As diferentes composições possíveis são representadas pelos pontos

pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, enquanto os pontos no interior do triângulo representam as possíveis misturas de três componentes. A variação de um determinado parâmetro (variável-resposta medida) em função da composição da mistura pode ser representada por uma superfície de resposta desenhada acima do triângulo (Figura 3a). A representação dessa superfície por suas curvas de nível fornece um diagrama triangular (Figura 3b).

O modelo linear para misturas ternárias ajustado é o seguinte:

$$\hat{y}_{123} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3, \text{ sendo } x_1 + x_2 + x_3 = 1$$

Entretanto, em muitos casos esse modelo não é capaz de explicar os resultados experimentais, sendo necessário empregar o modelo quadrático, conforme a equação adaptada pela restrição ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$), a seguir:

$$\hat{y}_{123} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \text{ (quadrático)}.$$

Quando os coeficientes das interações são positivos, diz-se que os componentes envolvidos apresentam efeito sinérgico e, quando negativos, efeito antagônico.

Caso efeitos não aditivos envolvendo a presença simultânea de três componentes sejam importantes na resposta de determinadas misturas ternárias (pontos no interior do triângulo), o modelo quadrático será insuficiente, sendo necessário o acréscimo de termos cúbicos para se obter uma equação eficaz. Muitas vezes, uma equação contendo apenas um termo cúbico descreve adequadamente a resposta em toda a região experimental. Trata-se de uma equação simplificada, com apenas um termo a mais do que o modelo quadrático (modelo cúbico especial). A seguir a equação descrita:

$$\hat{y}_{123} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \text{ (cúbico especial)}.$$

O delineamento experimental geralmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é conhecido por *centroid simplex*, que acrescenta um ponto central representando a mistura ternária em partes iguais. Os valores dos termos não cúbicos são os mesmos do modelo quadrático. Perto dos lados do triângulo, as previsões do modelo cúbico são muito

parecidas com as do modelo quadrático, porque uma das três proporções fica próxima de zero e o termo cúbico deixa de ter importância. Na região central, por outro lado, as previsões dos dois modelos diferem bastante, o valor do termo cúbico passa a ter um valor numérico da mesma ordem de grandeza das outras contribuições.

(a) Superfície de resposta para as possíveis misturas

(b) Diagrama triangular com curvas de nível dessa superfície de resposta

Figura 3. Representação espacial de misturas.

Obtido o modelo para a variável-resposta a ser estudada, primeiramente avalia-se por análise de variância paramétrica (ANOVA), se a regressão é significativa e, portanto, o modelo é significativo. Também deve-se avaliar a falta de ajuste (*lack of fit*) do mesmo. Uma falta de ajuste significativa é interpretada como uma indicação de que um modelo mais complexo é requerido para representar adequadamente o comportamento do sistema ou de que não é possível modelar o sistema estudado. O cálculo da falta de ajuste é feito fracionando o erro total nos termos de erro puro (calculado usando os pontos de replicata) e de falta de ajuste.

Quando várias respostas são envolvidas, prefere-se o termo otimização de respostas combinadas (CASTRO *et al.*, 2003) ou otimização multi-resposta (ARTEAGA *et al.*, 1994).

“A otimização pode ser definida como a escolha da melhor alternativa dentre um grupo específico de possibilidades”. Portanto, quando se desenvolve um produto ou fórmula trabalha-se essencialmente com um problema de otimização. A otimização de processos ou produtos exige o planejamento de ensaios para se determinarem os níveis ótimos dos componentes. Esses componentes são as variáveis independentes ou fatores e as variáveis dependentes ou resposta devem ser otimizadas (maximizadas ou minimizadas) (CASTRO *et al.*, 2003).

A otimização pela metodologia da superfície de resposta é a mais usada na ciência e tecnologia de alimentos, possivelmente porque sua teoria é completa, eficiente e simples (BOX e DRAPER, 1987). Através deste conjunto de técnicas, é possível avaliar os efeitos dos principais fatores nas respostas desejadas, bem como a interação entre elas.

A otimização de respostas combinadas, a partir de modelos polinomiais, envolve problemas que não são simples ou diretos. O uso de procedimentos de justaposição de gráficos é de baixa eficiência quando o número de respostas aumenta e não é possível sua automatização (CASTRO *et al.*, 2003). Felizmente, hoje já há programas que executam essa otimização. Os métodos de otimização multi-resposta empregando programas são automáticos, bastando o usuário fornecer os modelos ajustados para o programa de otimização e este buscará, dentro do espaço experimental definido, a combinação de fatores que forneça a melhor multi-resposta.

Uma definição matemática para a função multi-resposta, como por exemplo, a função de desejabilidade ou conveniência de DERRINGER e SUICH (1980), também

é necessária. O método de DERRINGER e SUICH (1980) calcula as desejabilidades individuais e global associadas com cada resposta e com todo o sistema, respectivamente. Ele é simples, fácil de aplicar, permite o julgamento subjetivo com relação à importância das variáveis-resposta. Embora esse método economize tempo, ele não explica como as respostas interagem com os fatores (GUILLOU e FLOROS, 1993).

Após a obtenção dos modelos ajustados para cada variável-resposta a ser otimizada, deve-se otimizá-las empregando-se uma das técnicas existentes, isto é, encontrar a melhor formulação possível com as condições experimentais utilizadas. Finalmente, deve-se avaliar a adequação dos modelos obtidos (validação), repetindo-se ensaios dentro da área experimental estudada, a fim de comparar os valores preditivos (esperados com base nos modelos) com os valores obtidos para cada variável-resposta.

Diante das boas perspectivas de utilização dos queijos como veículos de probióticos e da possibilidade de incorporação de prebióticos nesses alimentos, o desenvolvimento de queijo *petit-suisse* simbiótico apresenta-se como uma alternativa de alimento funcional interessante, não apenas por sua boa aceitabilidade por diferentes faixas etárias de consumidores, mas também pelo potencial de crescimento de mercado. O *petit-suisse* poderá, dessa forma, popularizar-se como um queijo de excelentes propriedades nutricionais e funcionais, atendendo, assim, os anseios da população por alimentos que promovam a saúde, além da nutrição.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Desenvolver um queijo tipo *petit-suisse* simbiótico, processado com a adição das culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* Lac4 e *Bifidobacterium lactis* BL04 e dos ingredientes prebióticos inulina, oligofrutose e mel;
- Avaliar a viabilidade das culturas probióticas, a presença de microrganismos contaminantes, a aceitabilidade sensorial, a textura instrumental e os parâmetros físico-químicos de acidez titulável, pH e umidade durante o seu armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 28 dias;
- Otimizar as misturas envolvendo fatores inulina, oligofrutose e mel adicionados a fim de se obter um queijo *petit-suisse* com boa viabilidade probiótica e potencial efeito prebiótico associados a características tecnológicas e organolépticas satisfatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Elaboração dos queijos

3.1.1. Ingredientes e aditivos

- a. Leite A desnatado e pasteurizado – comercialmente distribuído (Salute, Descalvado, Brasil) e fornecido diretamente pelo fabricante.
- b. Coagulante comercial – coagulante HA-LA (Christian Hansen, Valinhos, Brasil).
- c. Culturas probióticas - microrganismos *Lactobacillus acidophilus* (Lac4, Ezal Dried, Danisco, Dangé, França), *Bifidobacterium lactis* (BL04, FloraFit, Danisco) e cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* (TA040, Ezal Dried, Danisco), todas liofilizadas do tipo DVS (“direct vat set” - para a adição direta ao leite, durante a elaboração do produto). Ressalta-se que a optou-se por uma cultura *starter* termofílica em função da necessidade de adaptação do processamento para uma temperatura de fermentação mais próxima da ideal para as culturas probióticas, o que inviabilizaria o emprego da cultura mesofílica de *Lactococcus lactis*, tradicionalmente utilizada para a fabricação do queijo Quark.
- d. Sacarose – açúcar refinado comercialmente distribuído (União, Limeira, Brasil).
- e. Cloreto de cálcio (Dinâmica, São Paulo, Brasil).
- f. Creme de leite esterilizado - tradicional, comercialmente distribuído (Nestlé, Araçatuba, Brasil).
- g. Oligofrutose – Beneo™ P95, Orafiti, Oreye, Belgium.
- h. Inulina – Beneo™ ST, Orafiti, Oreye, Belgium.
- i. Mel de Eucalipto (Apiário do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, Brasil).
- j. Polpa de morango integral – congelada, sem conservantes (Maisa, Mossoró, Brasil).
- k. Corante natural carmim de cochonilha (Plury Química, Diadema, Brasil).
- l. Estabilizante e emulsionante – goma xantana (Rhodigel 80, Danisco) e gelatina em pó sem sabor (Oetker, Amparo, Brasil).
- m. Aroma natural idêntico de morango (Mylner, São Paulo, Brasil).

3.1.2. Elaboração do queijo Quark (Figura 4)

Figura 4. Fluxograma empregado na elaboração da massa-base de queijo Quark.

O processamento do queijo Quark foi desenvolvido experimentalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP, conforme apresentado na Figura 4 e descrito a seguir:

1. O leite pasteurizado foi transferido para um recipiente e aquecido, em banho de água, até 37°C;

2. o leite aquecido foi transferido para caixas térmicas e recebeu cloreto de cálcio (2,5 g/10 L de leite), foi homogeneizado e recebeu as culturas probióticas (*L. acidophilus* 3% m/v e *B. lactis* 2% m/v) e a cultura *starter* (*S. thermophilus* 3% m/v), diretamente adicionadas ao leite, seguido de uma nova homogeneização;
3. aguardou-se até atingir pH 6,3, quando o coagulante, previamente diluído (0,05g em 50 mL de água fervida e resfriada), foi adicionado numa proporção (0,05g/10L de leite) superior à tradicionalmente empregada para a fabricação do Quark, para evitar um prolongamento no período de coagulação, especialmente em função da temperatura de fermentação ser bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos;
4. seguiu-se nova etapa de homogeneização;
5. aguardou-se a coagulação (pH 5,5-5,7), quando, então, a coalhada foi cortada;
6. transferiu-se a coalhada para sacos de algodão esterilizado e procedeu-se à dessoragem em câmara (15°C/15h);
7. o queijo Quark elaborado aguardou a elaboração da mistura para obtenção do *petit-suisse* em refrigeração (4±1°C/2h) após ser embalado em sacos plásticos.

3.1.3. Elaboração do queijo *petit-suisse* (Figura 5)

Figura 5. Fluxograma empregado na elaboração de queijo *petit-suisse*.

1. Foi realizada a mistura do queijo Quark, do creme de leite e do açúcar em misturador (Multiprocessador de Alimentos UM-12, Geiger, Pinhais, Brasil) até completa homogeneização (não visualização de grumos);
2. o produto recebeu a adição de corante e aroma e também da pré-mistura de polpa de morango e gelatina (polpa pasteurizada em banho de água a 85°C/20 minutos e gelatina dissolvida a seguir) e foi homogeneizado novamente;
3. finalmente, adicionaram-se a goma xantana e os demais ingredientes de acordo com as formulações (Tabelas 1 e 2), homogenizou-se mais uma vez e o produto foi embalado em potes plásticos adequados para o produto (capacidade de 50g), na quantidade de 35g, selados com tampa aluminizada e armazenados sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 28 dias.

3.1.4. Formulação do queijo *petit-suisse*

A tabela 1 apresenta os ingredientes empregados no presente trabalho para a formulação do queijo *petit-suisse* e suas respectivas quantidades.

Oito ensaios foram desenvolvidos, referidos no texto como T1-T8, sendo T8 o ensaio-controle (tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes empregados para a formulação do queijo *petit-suisse* e suas respectivas quantidades.

Ingredientes (g 100g ⁻¹)	T8 - control	T1-T7
1. queijo quark (massa base)	63,90	57,51
2. polpa de morango	11,00	9,90
3. sacarose	10,00	9,00
4. creme de leite	14,00	12,60
5. gelatina	0,50	0,45
6. goma xantana	0,50	0,45
7. corante	0,060	0,054
8. aroma	0,040	0,034
9. ingrediente prebiótico	-	10,00

- = sem adição

3.2. Delineamento experimental

A pesquisa foi desenvolvida através de ensaios que testaram os fatores oligofrutose, inulina e mel, adicionados em diferentes proporções, na formulação de queijo *petit-suisse* probiótico obtida a partir de ensaios prévios sempre totalizando 10% da formulação final. O delineamento experimental utilizou a metodologia de superfície de resposta para misturas simples com um ponto central e três fatores, para a obtenção de um modelo que representasse o comportamento dos três fatores analisados (oligofrutose, inulina e mel), conforme apresenta a tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental empregado.

Número do Ensaio	Proporção de cada ingrediente na mistura	Valores de cada ingrediente (g) em 100 g de queijo <i>petit-suisse</i> ¹		
	(x_1, x_2, x_3)	Oligofrutose (x_1)	Inulina (x_2)	Mel (x_3)
T1	(1,0,0)	10	0	0
T2	(0,1,0)	0	10	0
T3	(0,0,1)	0	0	10
T4	(1/2, 1/2, 0)	5	5	0
T5	(1/2, 0, 1/2)	5	0	5
T6	(0, 1/2, 1/2)	0	5	5
T7	(1/3, 1/3, 1/3)	3.33	3.33	3.33
T8	(0, 0, 0)	-	-	-

¹ 10g da mistura total foram adicionadas aos demais ingredientes utilizados nas formulações de queijo *petit-suisse*
 - = ingredientes não adicionados (T8 – ensaio controle)

Os ensaios foram aleatorizados e os testes estatísticos foram aplicados usando o *Software Statistica for Windows*, versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3.3. Períodos de amostragem

As embalagens contendo amostras de queijos *petit-suisse* preparados de acordo com o ensaio realizado foram mantidas a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ e analisadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias para todas as variáveis-resposta, exceto a aceitabilidade sensorial, analisada após 7, 14, 21 e 28 dias e a determinação quantitativa de frutanos, analisada após 1, 21 e 28 dias.

3.4. Determinação dos parâmetros físico-químicos

Decorridos os diferentes tempos de armazenamento refrigerado descritos no item 3.3, as análises físico-químicas foram determinadas (em triplicata) nos queijos *petit-suisse*, conforme apresentado a seguir:

- pH em Medidor de pH-Analyser Modelo 300M (Analyser, São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo DME-CF (Digimed, São Paulo, Brasil);
- Acidez titulável em ácido láctico, segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985);
- Umidade – método gravimétrico de secagem em estufa a vácuo (Marconi MA030112) a 70°C até peso constante, a partir de 5 g.

3.5. Determinação da textura instrumental

Decorridos os diferentes tempos de armazenamento refrigerado descritos no item 3.3, o perfil instrumental de textura dos queijos foi determinado (em quintuplicata) em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra) através de teste de dupla compressão de 35g de amostras contidas nas embalagens plásticas, utilizando cilindro de alumínio com 25 mm de diâmetro, distância e velocidade de compressão de 10 mm e de 1 mm/s, respectivamente e temperatura de $4\pm1^{\circ}\text{C}$. Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems) e analisaram-se os atributos firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade.

3.6. Determinação da composição centesimal

As análises de determinação da composição centesimal foram realizadas, em triplicata, nos queijos *petit-suisse*, a partir de amostras mantidas congeladas após 1 dia de armazenamento refrigerado (no dia seguinte à produção), conforme apresentado a seguir:

- Umidade: método gravimétrico de secagem em estufa a vácuo (Marconi MA030112) a 70°C até peso constante, a partir de 5;
- Gordura: através da extração de lipídios com éter etílico, em Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- Proteínas: através da análise do conteúdo de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38; adaptado de ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2003);
- Cinzas: método gravimétrico por incineração de 2 g de amostra seca a 550°C até eliminação completa de carvão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- Carboidratos totais (incluindo fibras): calculado pela diferença para se obter 100% da composição total.

3.7. Determinação dos parâmetros microbiológicos

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item 3.3, os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, a cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e os contaminantes coliformes e *E.coli*, *Staphylococcus* spp. e bolores e leveduras foram enumerados.

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

Lactobacillus acidophilus foi enumerado utilizando a técnica da semeadura em profundidade de 1 mL de cada diluição em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS agar, Oxoid Ltd. Basingstoke, Reino Unido) modificado pela substituição de glucose por maltose como principal fonte de carboidratos, conforme descrito pela *International Dairy Federation* (IDF Standard 306, 1995), após três dias de incubação

em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) a 37°C. *Bifidobacterium lactis* foi enumerado, utilizando a técnica da semeadura em profundidade de 1 mL de cada diluição em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS agar, Oxoid) acrescido de propionato de sódio (0,3% m/v) e cloreto de lítio (0,2% m/v), após três dias de incubação (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) a 37°C, conforme descrito por VINDEROLA e REINHEIMER (1999).

Para a enumeração de *Streptococcus thermophilus*, utilizando a técnica da semeadura em profundidade, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas que posteriormente receberam ágar M17 (Oxoid) adicionado de lactose (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%, fundido e resfriado a 45°C. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 2 dias.

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar Baird-Parker (BP, base para ágar Baird-Parker, Oxoid, adicionado de telurito e gema de ovo – suplemento SR054C, Oxoid), para a enumeração de *Staphylococcus* spp. Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (Petrifilm™ EC, 3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a enumeração de coliformes e de *Escherichia coli* e para placas Petrifilm™ Yeasts and Moulds Count Plates (Petrifilm™ YM, 3M Microbiology), para a enumeração de bolores e leveduras, de acordo com as instruções do fabricante. A incubação das placas de ágar Baird-Parker (BP) e de Petrifilm™ EC foi realizada a 35°C e 37°C por 48 e por 24 horas, respectivamente, e as de Petrifilm™ YM, a 20-25°C por 5 dias.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.8. Determinação quantitativa de frutanos

A quantificação de frutanos foi realizada nos ensaios T1 a T7, através do método de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência, com detector de pulso amperométrico, adaptado do método 997.08 AOAC, conforme descrito por HOEBREGS (1997). Foram utilizadas amostras dos queijos previamente congelados após 1, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado, em duplicata, e liofilizadas. A fibra Beneo™ ST foi analisada, em duplicata, paralelamente às amostras de queijo *petit-suisse*, para verificar a eficiência do método, em comparação ao laudo do

fabricante. A enzima Fructozyme® L (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) foi utilizada para a hidrólise enzimática das amostras. Soluções dos açúcares padrões sacarose (Sucrose 99+%, A.C.S., Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA), glicose (α -D-Glucose, A.C.S., Aldrich), frutose (D(-)-Fructose, 99+%, D-Fructose, 99+%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) e galactose (D-Galactose, 97%, Aldrich) também foram analisadas pelo mesmo método de cromatografia para a correção final dos resultados de carboidratos das amostras de queijo e Beneo™ ST. Foi utilizado um cromatógrafo Dionex® HPLC System, contendo injetor automático AS50, bomba GP40, detector de pulso amperométrico ED40 com eletrodo de trabalho de ouro e coluna Carbowax PA1 com respectiva pré-coluna (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA). O gradiente utilizado iniciou-se com 40% de H₂O e 60% de NaOH 18 mM, atingindo 90% de NaOH 18 mM após 15 minutos e 100% de NaOH 18 mM após 25 minutos. O volume de injeção foi de 25 μ L.

3.9. Avaliação sensorial dos queijos

A escolha do método de avaliação sensorial adotado foi baseada em alguns requisitos, de acordo com o tipo de desenvolvimento do queijo *petit-suisse* a que se propôs nesta pesquisa.

O primeiro deles referiu-se à necessidade de mensurar quantitativamente o grau de aceitação do consumidor relativamente a um produto em desenvolvimento que apresenta um conceito novo - o da funcionalidade. É fundamental conhecer o quanto esse produto seria aceito sensorialmente pelo consumidor, subjetivamente. Sabe-se que um produto que não apresenta boa avaliação em testes de aceitação com o consumidor provavelmente falhará quando for para o comércio, a despeito do *marketing* feito sobre ele, pois as características organolépticas geralmente estão em primeiro lugar para o consumidor. Portanto, nesse caso, não caberia qualquer tipo de comparação com produtos tradicionais encontrados no mercado.

Também em função do delineamento experimental empregado no presente trabalho, a intenção foi otimizar as formulações em função da aceitação sensorial. A metodologia da superfície de resposta para misturas exige a quantificação do parâmetro medido para gerar um modelo matemático que represente o universo amostral avaliado.

Finalmente, como o queijo foi avaliado ao longo do armazenamento, o maior interesse era saber se a alteração produzida pelo armazenamento poderia comprometer o 'grau de gostar' dos consumidores, pois geralmente espera-se estabilidade do produto durante a sua vida de prateleira.

Preliminarmente foi realizada uma avaliação sensorial empregando o teste de diferença com consumidores comparando o produto de uma marca comercial com diferentes datas de fabricação, a qual revelou que o consumidor aceita as alterações do queijo *petit-suisse* durante a vida de prateleira.

Assim, o uso de testes discriminativos não seria apropriado para tal objetivo, pois, conforme relatado por BOWER (1996), tais testes são categóricos ou nominais, mostrando apenas se há ou não diferenças entre as amostras, mas não dizem o grau de extensão da diferença. Esse tipo de teste só foi empregado para a comparação de atributos preferidos e rejeitados. Para se quantificar o grau de aceitação dos novos produtos pelos consumidores aplicou-se o teste de aceitabilidade com emprego de escala hedônica de nove pontos.

3.9.1. Provadores

Um total de 560 provadores, de ambos os sexos, foram recrutados dentre funcionários, alunos e docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e de outras unidades da USP, através de anúncios.

Cada provador testou, no máximo, duas amostras de diferentes ensaios. O número de provadores não treinados (consumidores) para cada ensaio em cada período de armazenamento ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$, após 7, 14, 21 e 28 dias) foi de 35 indivíduos. Alguns provadores estiveram presentes em mais de uma sessão por estarem disponíveis durante o período experimental.

A idade dos provadores variou de 18 a 60 anos, sendo 55,18% de mulheres.

Todos os provadores eram pessoas saudáveis e aceitaram participar das análises previamente, atestando que gostavam e consumiam queijo *petit-suisse* e que não possuíam qualquer problema de alergia e/ou hipersensibilidade aos ingredientes das formulações dos queijos testados (Anexo 2).

As avaliações sensoriais das amostras de queijo *petit-suisse* foram realizadas após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Anexo 3).

3.9.2. Ficha de resposta

O grau de aceitação dos provadores foi medido solicitando-lhes para avaliarem o quanto apreciaram o produto de forma geral, através do uso de uma escala hedônica de nove pontos (DUTCOVSKY, 1996) (Anexo 1). Na mesma ficha, os provadores também responderam a duas questões - quanto ao atributo de que mais gostaram e o de que menos gostaram.

Os Anexos 1, 2 e 3 apresentam o modelo de ficha aplicada à análise sensorial, o modelo de ficha utilizada no recrutamento dos participantes da análise sensorial e o ofício da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, aprovando a realização da análise sensorial, respectivamente.

3.9.3. Procedimento

De acordo com o delineamento experimental (Tabela 2), oito ensaios foram avaliados durante o período de armazenamento (7, 14, 21 e 28 dias). O delineamento empregado foi o de blocos incompletos balanceados ($t=8$, $\lambda=1$, $k=2$, $r=7$) (Hinkelmann & Kempthorne, 1994). Todos os 24 blocos, contendo 2 amostras, foram repetidos 5 vezes para cada período de armazenamento ($28 \times 5 \times 4 = 560$ testes).

A avaliação foi conduzida sob condição controlada no Laboratório de Análise Sensorial do Bloco 16 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As amostras foram servidas uma por vez, com a ordem de apresentação balanceada entre os provadores. Solicitou-se aos provadores para examinarem visualmente e provarem as amostras de queijo e, então, marcarem o número correspondente à aceitação usando a escala hedônica de nove pontos. Finalmente, os provadores responderam às duas questões propostas. Cada provador avaliou não mais do que duas amostras. Antes da primeira amostra, e entre a primeira e a segunda amostras, os provadores foram orientados a degustar biscoito *cream craker* e rinsar a boca com água mineral natural.

As amostras de queijo *petit-suisse* foram servidas em potes plásticos identificados com códigos contendo seqüências de três dígitos aleatórios. As amostras foram apresentadas aleatoriamente para prevenir a interferência da ordem de apresentação nos resultados e foram armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C) e

servidas imediatamente após a retirada do refrigerador. O tamanho da porção de cada amostra servida foi de 20g. Colheres plásticas foram fornecidas.

3.10. Análise estatística

3.10.1. Otimização

A Metodologia da Superfície de Resposta é baseada no uso do método de ajuste pelo dos mínimos quadrados para a construção de modelos empíricos (CORNELL, 2002). Os modelos definem relações quantitativas entre os fatores e as variáveis-dependentes, cobrindo toda a área experimental testada e incluindo as possíveis interações. A equação polinomial canônica de Scheffé foi usada para avaliar o efeito dos três prebióticos sobre as seguintes variáveis-dependentes, selecionadas dentre os diversos parâmetros analisados: viabilidade das bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, parâmetro de textura firmeza, conteúdo de frutanos e custos, aos 21 dias de armazenamento para os ensaios T1 a T7, conforme segue:

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3, \text{ onde:}$$

$b_1, b_2, \dots$: coeficientes da regressão

x_1, x_2, x_3 : fatores oligofrutose, inulina e mel respectivamente ($\sum_{i=1}^q x_i = 1, 1 \geq x_i \geq 0$)

$\hat{y}$: resposta determinada no produto

Os coeficientes dos modelos e a análise de variância (com aplicação do teste F com $p < 0,05$) foram calculados. Os resultados foram apresentados graficamente (diagrama triangular). As variáveis-dependentes foram otimizadas usando uma função multi-resposta - a função de desejabilidade ou conveniência de DERRINGER e SUICH (1980), calculando-se as desejabilidades individuais e global associadas com cada resposta e com todo o sistema, respectivamente. Posteriormente, os ensaios de validação dos modelos foram realizados, confrontando os resultados esperados com os observados.

3.10.2. Outras análises estatísticas realizadas

Outros testes estatísticos foram aplicados entre os oito ensaios e ao longo do período de armazenamento (1, 7, 14, 21 e 28 dias). As variáveis-resposta foram expressas como média [desvio padrão], embora alguns resultados não tenham apresentado normalidade (avaliada através do teste de Shapiro-Wilks com $p < 0,05$). A homogeneidade das variâncias foi previamente analisada através do teste de Levene, e parâmetros com desvios significativos foram submetidos aos respectivos testes não-paramétricos (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

- Comparações entre os diferentes ensaios para o mesmo período de armazenamento:

- a) Os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e o teste de Mann Whitney U para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998a).

- b) Quando houve homogeneidade de variâncias, procedeu-se à análise de variância paramétrica e aplicação do teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$) (BOWER, 1998b).

- Comparações entre os diferentes períodos de armazenamento para o mesmo ensaio:

- a) Os casos onde a homogeneidade de variância não foi observada foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Friedman e o “LSD rank” para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1998a).

- b) Quando houve homogeneidade de variâncias, procedeu-se à análise de variância para medidas repetidas e aplicação do teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$) (BOWER, 1998b).

As inter-relações entre alguns parâmetros estudados foram examinadas utilizando correlação linear de Pearson e regressão linear múltipla.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados analisados estatisticamente, através da comparação entre os diferentes ensaios e entre os períodos de armazenamento para cada ensaio separadamente, para cada parâmetro estudado, encontram-se apresentados a seguir.

4.1. Microrganismos probióticos e *starter*

4.1.1. Probióticos

A tabela 3 mostra as diferentes populações de probióticos obtidas para os diferentes ensaios realizados ao longo do armazenamento dos queijos, bem como os resultados das análises estatísticas realizadas.

As populações dos probióticos decresceram durante o período de armazenamento refrigerado, tanto para *L. acidophilus* quanto para *B. lactis*. A amplitude entre as populações médias mais altas e mais baixas (1 a 28 dias), considerando um mesmo ensaio, não foi superior a 0,74 log ufc g⁻¹ e 0,37 log ufc g⁻¹ respectivamente para *L. acidophilus* e *B. lactis*.

Embora variações significativas nas populações de *L. acidophilus* e *B. lactis* tenham ocorrido entre os diferentes ensaios e ao longo do tempo, os resultados foram de 10⁶ a 10⁷ ufc g⁻¹ durante toda a vida de prateleira do produto, sendo as citadas populações sugeridas como as mínimas aceitáveis por alguns pesquisadores (LEE e SALMINEN, 1995; BLANCHETTE, 1996; RYBKA e FLEET, 1997; CHARTERIS *et al.*, 1998; HOIER *et al.*, 1999; VINDEROLA e REINHEIMER, 2000) para produzirem efeitos benéficos à saúde do intestino grosso, representando 10⁸ a 10⁹ ufc 100g⁻¹ de consumo diário do alimento. Além disso, segundo normatização brasileira, para que um alimento probiótico exerça seus efeitos benéficos, é recomendado que o mesmo viabilize o fornecimento de 10⁸ a 10⁹ ufc dia⁻¹ (ANVISA, 2006).

Diversos trabalhos envolveram a elaboração de produtos lácteos com a adição de culturas probióticas. VINDEROLA *et al.* (2000) relataram que cepas de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, *B. bifidum*, *B. longum* e *L. casei* apresentaram sobrevivência satisfatória em queijo fresco argentino, processado

usando leite ultrafiltrado e usando culturas lácticas *starter* durante a fabricação do queijo.

BURITI *et al.* (2005a), processando queijo minas frescal potencialmente probiótico, obtiveram viabilidade de *L. acidophilus* variando de 5,46 a 6,93 log ufc g⁻¹ durante o armazenamento. Ainda assim, o queijo foi considerado um bom veículo para o fornecimento da cultura probiótica referida.

Tabela 3. Viabilidade dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* (A) e *Bifidobacterium lactis* (B), expressa em média [desvio padrão]* log ufc g⁻¹, obtida para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4±1 °C.

A – *Lactobacillus acidophilus* LAC4

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
T1	6,99 [0,06] ^{bD}	6,81 [0,02] ^{dCD}	6,69 [0,05] ^{abBC}	6,60 [0,06] ^{bcB}	6,25 [0,18] ^{abA}
T2	6,99 [0,08] ^{bC}	6,80 [0,05] ^{dB}	6,76 [0,06] ^{bAB}	6,66 [0,02] ^{cAB}	6,62 [0,05] ^{cA}
T3	6,49 [0,16] ^{aAB}	6,58 [0,03] ^{aAB}	6,73 [0,04] ^{aB}	6,49 [0,04] ^{abcAB}	6,33 [0,18] ^{abcA}
T4	6,85 [0,16] ^{bD}	6,76 [0,03] ^{cdCD}	6,65 [0,01] ^{abBC}	6,55 [0,04] ^{abcB}	6,33 [0,05] ^{abcA}
T5	6,83 [0,09] ^{bB}	6,63 [0,04] ^{abA}	6,67 [0,09] ^{aAB}	6,65 [0,02] ^{cA}	6,53 [0,05] ^{bcA}
T6	6,76 [0,04] ^{bB}	6,66 [0,05] ^{abdAB}	6,66 [0,06] ^{abAB}	6,59 [0,06] ^{bcAB}	6,58 [0,10] ^{cA}
T7	6,74 [0,01] ^{abC}	6,57 [0,03] ^{aBC}	6,54 [0,05] ^{aB}	6,43 [0,08] ^{abB}	6,17 [0,13] ^{aA}
T8	6,81 [0,08] ^{bC}	6,69 [0,03] ^{bcC}	6,45 [0,02] ^{aB}	6,39 [0,11] ^{aB}	6,08 [0,07] ^{aA}

B – *Bifidobacterium lactis* BL04

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
T1	7,60 [0,09] ^{bB}	7,53 [0,05] ^{bAB}	7,48 [0,03] ^{bAB}	7,38 [0,05] ^{bcA}	7,34 [0,10] ^{abA}
T2	7,69 [0,05] ^{bC}	7,56 [0,07] ^{bBC}	7,48 [0,09] ^{bAB}	7,38 [0,07] ^{bcA}	7,35 [0,03] ^{bA}
T3	7,44 [0,04] ^{aC}	7,41 [0,06] ^{abBC}	7,29 [0,03] ^{aAB}	7,26 [0,07] ^{abA}	7,21 [0,04] ^{aA}
T4	7,69 [0,04] ^{bB}	7,49 [0,04] ^{bA}	7,40 [0,02] ^{abA}	7,44 [0,07] ^{cA}	7,37 [0,05] ^{bA}
T5	7,44 [0,04] ^{aC}	7,28 [0,07] ^{aAB}	7,38 [0,04] ^{abBC}	7,24 [0,02] ^{abA}	7,25 [0,04] ^{abA}
T6	7,40 [0,03] ^{aB}	7,41 [0,07] ^{abB}	7,28 [0,05] ^{aAB}	7,20 [0,06] ^{aA}	7,26 [0,02] ^{abA}
T7	7,60 [0,05] ^{bD}	7,53 [0,05] ^{bCD}	7,45 [0,04] ^{bBC}	7,38 [0,01] ^{bcAB}	7,31 [0,02] ^{abA}
T8	7,69 [0,04] ^{bC}	7,46 [0,04] ^{bB}	7,47 [0,06] ^{bB}	7,38 [0,04] ^{bcAB}	7,32 [0,03] ^{abA}

* n=3

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

JURKIEWICZ (1999) relatou que a maioria das cepas de *L. acidophilus* sobrevive bem em alimentos com baixo pH, armazenados sob refrigeração. Segundo LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (2001), *Lactobacillus* apresenta boa resistência em produtos lácteos armazenados em baixas temperaturas, enquanto *Bifidobacterium* apresenta comportamento oposto. Por outro lado, CHARTERIS *et al.* (1998) comentaram que produtos de leite fermentado contendo espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* comumente apresentam viabilidade decrescente, principalmente durante o armazenamento refrigerado, particularmente devido ao baixo pH desses produtos. RYBKA e KAILASAPATHY (1995) verificaram que em iogurte ABT (pH 4,3), produzido com *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*, a população de *L. acidophilus* permaneceu 10^7 ufc ml⁻¹, durante 36 dias de armazenamento a 4°C.

Em ensaios preliminares com queijo *petit-suisse* as viabilidades dos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* diferiram pouco entre as duas formulações testadas (uma com 10% de inulina e outra com 10% de oligofrutose), revelando populações sempre acima de 7 log ufc g⁻¹ (CARDARELLI e SAAD, 2003).

MARUYAMA *et al.* (2006), por sua vez, obtiveram populações de *L. acidophilus* acima de 6 log ufc g⁻¹ durante o armazenamento refrigerado de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico, adicionado das mesmas cepas empregadas no presente trabalho. A redução significativa de pH não influenciou a viabilidade de *L. acidophilus* durante a vida de prateleira, embora os valores de pH tenham atingido níveis abaixo do ótimo (pH 5,5 a 6,0, de acordo com GOMES e MALCATA, 1999) para a multiplicação deste probiótico. A viabilidade de *Bifidobacterium lactis*, entretanto, foi sempre superior a 7 log ufc g⁻¹, aproximadamente 1 ciclo logarítmico superior à de *L. acidophilus*, durante o período de armazenamento.

Assim como relatado por MARUYAMA *et al.* (2006), no presente trabalho, a viabilidade de *B. lactis* foi sempre superior à de *L. acidophilus*, principalmente como consequência de um inóculo inicial maior do primeiro probiótico. Esses resultados de viabilidade elevada para *B. lactis* não eram esperados, já que as bifidobactérias são descritas como mais sensíveis a variações de pH (ótimo entre 6 e 7, de acordo com GOMES e MALCATA, 1999) e menos tolerantes às temperaturas de refrigeração, o que pode levar à pequena multiplicação em produtos lácteos (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001).

Por outro lado, GARRO *et al.* (2005) obtiveram a menor multiplicação de *B. longum* no meio MRS-rafinose em pH 4,5, embora o microrganismo tenha se multiplicado em faixas distintas de pH, variando de 4,5 até 6,0.

VINDEROLA *et al.* (2002) estudaram o efeito de compostos associados a produtos lácteos fermentados sobre a viabilidade de culturas *starter* e a de probióticos, observando que os sucos de frutas adicionados inibem, especialmente, os estreptococos e lactococos, mas pouco afetam probióticos, como bifidobactérias e lactobacilos. Já FRANCK e HASSAN (2001) relataram que o efeito inibitório cessa quando os sucos são neutralizados, indicando que, na verdade, as células bacterianas são injuriadas pelos ácidos presentes. No presente trabalho, não foi observada inibição da cultura *starter* devido à presença de polpa de morango e dos demais ingredientes empregados na elaboração de queijo *petit suisse*.

Observou-se também, nesta pesquisa, que a presença dos prebióticos nos ensaios T1 a T7 mostrou uma tendência (embora não significativa) de menor redução na viabilidade de *Bifidobacterium lactis*, em comparação ao ensaio-controle durante o armazenamento. O mesmo comportamento ocorreu para a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*, exceto no ensaio T1 (10% de oligofructose). SHIN *et al.* (2000) e BRUNO *et al.* (2002) relataram previamente uma retenção de viabilidade significativamente elevada quando bifidobactérias se multiplicaram na presença de prebióticos, em comparação ao controle.

Outras pesquisas mostraram que prebióticos do tipo inulina também auxiliam na sobrevivência de organismos probióticos durante o processamento e armazenamento de produtos lácteos (DESAI, *et al.*, 2004; ÖZER *et al.*, 2005; CAPELA *et al.*, 2006). DESAI *et al.* (2004) observaram que sete cepas de *Lactobacillus* – *L. casei* (ASCC 1520, CSCC 2607, ASCC 290 e ASCC 279), *L. paracasei* ASCC 292, *L. rhamnosus* ASCC 1521 e *L. zae* ATCC 15820 – atingiram melhor viabilidade quando multiplicadas em leite desnatado reconstituído suplementado com 5% m/v de inulina.

ÖZER *et al.* (2005) relataram que não houve aumento na viabilidade das culturas *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e probiótica de *Lactobacillus acidophilus*, em iogurte suplementado com 0,5% a 1,0% m/v de inulina. Por outro lado, os autores relataram que a viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* aumentou. Além disso, CAPELA *et al.* (2006) verificaram que a adição de 2% (m/v) de cada uma das fibras comerciais inulina Raftiline® ST,

amido resistente de milho e, principalmente oligofrutose Raftilose® P95 melhoraram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* 33200, *Lactobacillus casei* 279, *Bifidobacterium longum* 536 e *Lactobacillus rhamnosus* GG, em iogurte fresco, quando comparados com o iogurte controle, durante quatro semanas de armazenamento a 4°C. Entretanto, as mesmas fibras não foram capazes de melhorar ou manter a viabilidade dos microrganismos probióticos em iogurtes liofilizados.

SHAMALA *et al.* (2000) estudaram, em condição *in vitro*, a viabilidade de *L. acidophilus* e *L. plantarum* e observaram que as populações aumentaram de 10 a 100 vezes quando mel foi adicionado ao meio, em comparação com meio contendo sacarose. Os mesmos autores alimentaram ratos, suplementarmente, com mel e houve aumento significativo nas populações das mesmas bactérias lácticas. Assim, consideraram que o mel possui efeitos fisiológicos benéficos nos animais assim alimentados, devido ao aumento significativo das bactérias lácticas citadas.

4.1.2. Starter

A tabela 4 mostra as diferentes populações de *S. thermophilus* obtidas para os diferentes ensaios realizados ao longo do armazenamento dos queijos, bem como os resultados das análises estatísticas realizadas.

A viabilidade da cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* apresentou variação significativa para todos os ensaios e ao longo do período de armazenamento. Entretanto, essa viabilidade foi bastante elevada e nunca inferior a 9,56 log ufc g⁻¹, confirmando que qualquer variação estatística encontrada não representa importância em termos microbiológicos.

A adição vantajosa de culturas probióticas em co-cultura com outras culturas, tanto probióticas como *starter*, tem sido relatada. Assim, a adição concomitante de uma cultura *starter* de *S. thermophilus* e das culturas probióticas *L. acidophilus*, *B. longum* e *L. casei* em queijo fresco argentino resultou em viabilidade variando de 8,46 a 9,33 log ufc g⁻¹ (VINDEROLA *et al.*, 2000), pouco inferior aos resultados encontrados na presente pesquisa.

Segundo OKASAKI *et al.* (2001), queijos Minas frescal adicionados de cultura ABT (Chr. Hansen), composta dos microorganismos *Lactobacillus acidophilus* (LA5), *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12), tiveram populações de

microrganismos probióticos elevadas durante todo o período de armazenamento, permanecendo sempre acima de 10^6 ufc g⁻¹. Já a população de *S. thermophilus* (cultura *starter*) permaneceu constante em 10^8 ufc g⁻¹.

Tabela 4. Viabilidade do microrganismo *starter Streptococcus thermophilus*, expressa em média [desvio padrão]* log ufc g⁻¹, obtida para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4±1 °C.

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
T1	9,74 [0,15] ^{1aA}	9,72 [0,08] ^{1aA}	9,60 [0,07] ^{1aA}	9,75 [0,02] ^{1abA}	9,56 [0,01] ^{1aA}
T2	9,81 [0,13] ^{1aA}	9,68 [0,07] ^{1aA}	9,66 [0,02] ^{1abA}	9,69 [0,07] ^{1abA}	9,61 [0,03] ^{1aA}
T3	9,69 [0,05] ^{1aAB}	9,62 [0,09] ^{1aA}	9,80 [0,03] ^{1cB}	9,68 [0,06] ^{1abAB}	9,81 [0,02] ^{1bcB}
T4	9,68 [0,03] ^{1aA}	9,65 [0,15] ^{1aA}	9,57 [0,04] ^{1aA}	9,69 [0,05] ^{1abA}	9,62 [0,03] ^{1aA}
T5	9,79 [0,03] ^{1aB}	9,59 [0,08] ^{1aA}	9,62 [0,05] ^{1abAB}	9,61 [0,10] ^{1aA}	9,71 [0,03] ^{1bAB}
T6	9,69 [0,08] ^{1aA}	9,63 [0,06] ^{1aA}	9,65 [0,06] ^{1abA}	9,70 [0,04] ^{1abA}	9,75 [0,06] ^{1bA}
T7	9,81 [0,07] ^{1aA}	9,75 [0,03] ^{1aA}	9,79 [0,04] ^{1cA}	9,82 [0,08] ^{1bA}	9,87 [0,03] ^{1cA}
T8	9,82 [0,09] ^{1aB}	9,77 [0,02] ^{1aAB}	9,74 [0,04] ^{1bcAB}	9,80 [0,01] ^{1bB}	9,64 [0,08] ^{1abA}

* n=3

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

A interação entre a cultura *starter* de *S. thermophilus* e as culturas probióticas parece ser interessante para a multiplicação ou, pelo menos, manutenção da viabilidade das probióticas. Segundo SHAH (2001), *L. acidophilus* e bifidobactérias se multiplicam vagarosamente no leite, uma vez que esse alimento não contém concentração suficiente de aminoácidos livres e peptídeos. Assim, segundo o autor, a adição simultânea de *S. thermophilus* auxiliaria no sentido de que esse microrganismo possui uma maior atividade proteolítica e produz grandes quantidades da enzima β-D-galactosidase. Conseqüentemente, auxiliaria na quebra da caseína do leite em oligopeptídeos, por sua vez degradados em peptídeos e aminoácidos, por ação das peptidases. Ainda, conforme relatado por SVENSSON (1999), a incorporação de *S. thermophilus* pode resultar em um ambiente mais anaeróbio do queijo, uma vez que esse microrganismo possui elevada capacidade de utilização do oxigênio dissolvido no meio, tornando o meio mais favorável para as bifidobactérias se multiplicarem.

Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho quanto à viabilidade de *L. acidophilus* e *B. lactis* e de *S. thermophilus* demonstram um promissor emprego do queijo *petit-suisse* como veículo probiótico.

4.2. Microrganismos contaminantes

4.2.1. *Staphylococcus* spp.

Quanto à população de *Staphylococcus* spp. (tabela 5), o ensaio T8 (controle) destaca-se por ter apresentado populações mais elevadas desse contaminante, possivelmente devido à contaminação do queijo quark utilizado como massa básica. Houve variação significativa nas populações ao longo do tempo para os ensaios T7 e T8. Para o T7, a contaminação mais elevada ocorreu nas duas primeiras semanas, o que sugere que possa haver um possível efeito inibitório ao longo do armazenamento refrigerado. Entretanto, o ensaio T8 apresentou as populações mais elevadas (perto de 2 log acima dos ensaios T1 a T6) durante todo o período de armazenamento e sem nenhum indício de inibição.

Todos os ensaios receberam tanto a cultura *starter* quanto as cepas probióticas, o que nos leva a descartar um possível efeito inibitório das mesmas sobre a população de *Staphylococcus* spp. Há estudos tanto demonstrando tal inibição quanto em sentido contrário.

FIORAMONTI *et al.* (2003) relatam, em um trabalho de revisão, que se tem demonstrado que as bactérias lácticas inibem *in vitro* a multiplicação de muitos patógenos entéricos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*. No mesmo sentido, *L. acidophilus* LA1-SCS apresentou atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra vários patógenos, incluindo *S. aureus*, sem interferir na microbiota normal do intestino grosso, como os lactobacilos e bifidobactérias. Os autores atribuíram o efeito a uma substância peptídica, a qual não é bacteriocina, produzida pelo microrganismo, e não à exclusão competitiva por aderência (BERNET-CAMARD *et al.*, 1997; COCONNIER *et al.*, 1997).

A enterocolite necrótica é uma doença relacionada com uma microbiota intestinal anormal em crianças, envolvendo espécies de vários gêneros, dentre eles *Staphylococcus*, e um estudo com a administração de *L. acidophilus* e *B. infantis* em recém-nascidos reduziu a incidência da doença, demonstrando o efeito antibacteriano desses microrganismos (HOYOS, 1999; NOMOTO, 2005). SAMESHIMA *et al.* (1998) relataram o efeito inibitório na multiplicação e na produção

de enterotoxinas de *S. aureus*, através do emprego de algumas cepas de lactobacilos isoladas do trato intestinal humano como culturas *starter* na fabricação de salsichas fermentadas. Entretanto, a cepa *L. acidophilus* FERM P-15119 utilizada não pode suprimir *S. aureus*, pois as populações de células viáveis desse microrganismo aumentaram durante a fermentação. HEIKKILA e SARIS (2003) isolaram bactérias comensais a partir de leite humano que apresentaram potencial uso na prevenção de infecções neo-natais causadas por *S. aureus*. Espécies de bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* estavam dentre os diferentes grupos isolados. FERNÁNDEZ *et al.* (2003) também testaram *in vitro* uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* UO001 de origem humana e obtiveram inibição da multiplicação de *Salmonella*, *Listeria* e *Campylobacter*, sem interferir na microbiota normal do trato gastrointestinal, mas não houve inibição de *S. aureus*.

Tabela 5. Populações de *Staphylococcus* spp., expressas em média [variação]* log ufc g⁻¹, obtidas para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4±1 °C.

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
T1	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T2	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T3	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T4	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T5	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T6	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T7	3,09[3,00–3,18] ^{bB}	2,84[2,48–3,08] ^{bB}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,95 ^{aA}
T8	3,70[3,65–3,76] ^{cA}	3,63[3,52–3,72] ^{cA}	3,62[3,5–3,65] ^{bA}	3,62[3,59–3,65] ^{bA}	3,77[3,68–3,91] ^{bA}

* Valores mínimos – máximos das populações obtidas para todas as amostras analisadas, se não apresentados significa que não houve variação; n=3

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

Outra alternativa interessante a se considerar é a possibilidade de inibição pela presença associada dos probióticos e prebióticos, conforme observado para o ensaio T7 ao longo do tempo, no presente trabalho. LIU *et al.* (2004) testaram o efeito de um produto simbiótico composto de 10¹⁰ ufc de cada um dos microrganismos *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus plantarum* e 2,5 g de cada

um dos prebióticos betaglucana, inulina, pectina e amido resistente, em pacientes com doença crônica no fígado, também relacionada com elevada viabilidade de *Staphylococcus*. Os autores observaram a redução das populações desses microrganismos nas fezes dos pacientes.

Por outro lado, o mel pode ser inibitório para a multiplicação de microrganismos deterioradores e patogênicos. MUNDO *et al.* (2004) estudaram 27 amostras de mel de diferentes fontes florais e localizações. Encontraram sensibilidade variável dos microrganismos aos méis, através de testes de sensibilidade com vários microrganismos deterioradores e patogênicos, mas 4 cepas de *S. aureus* e também *L. acidophilus* demonstraram-se sensíveis. RASTALL *et al.* (2005) relataram que oligossacarídeos prebióticos poderiam atuar bloqueando sítios receptores comuns para patógenos intestinais, através de sua presença no lúmen intestinal.

Assim, parece-nos que esses possíveis efeitos inibitórios deveriam ser melhor estudados com a elaboração de queijos a partir de leite com diferentes graus de contaminação por *Staphylococcus* spp., e mais importante seria detectar se a contaminação corresponde a cepas patogênicas de *Staphylococcus*, como o *S. aureus*.

4.2.2. Coliformes e *E. coli*

Não foram detectados coliformes e *E.coli* em nenhum dos períodos de armazenamento dos diferentes ensaios realizados, indício de que o leite empregado como matéria-prima apresentava boa qualidade higiênica para processamento com relação a esses contaminantes. VEIGA *et al.* (2000) analisaram produtos comerciais e também obtiveram número mais provável de coliformes a 30°C e a 45°C inferiores a 0,03/g. A legislação brasileira para queijos de muito alta umidade aceita até 10² coliformes g⁻¹ para coliformes a 45°C (ANVISA, 2001).

4.2.3. Bolores e leveduras

Com relação às populações de bolores e leveduras, no presente trabalho, as variações entre os ensaios e ao longo do tempo têm pouca importância prática, pois os resultados foram sempre inferiores àqueles estabelecidos pela legislação

brasileira anterior para queijos de muito alta umidade (até 5×10^3 bolores e leveduras g^{-1} , equivalentes a $3,7 \log \text{ufc g}^{-1}$) (BRASIL, 1996), não havendo limites para esses contaminantes, de acordo com a legislação atual (ANVISA, 2001). Apenas deve-se considerar que, embora abaixo dos limites da legislação, após 28 dias de armazenamento, a presença de bolores e leveduras em todos os ensaios demonstrou que pode ter ocorrido uma contaminação ambiental durante o processamento (tabela 6).

VEIGA *et al.* (2000) encontraram valores inferiores a $2,7 \log \text{ufc g}^{-1}$ em produtos comerciais de queijo *petit-suisse* sabor morango. Já MORGADO e BRANDÃO (1998) relataram que a indústria possui padrões microbiológicos mínimos de qualidade para o queijo *petit-suisse*, nos quais as populações de bolores e leveduras devem ser sempre inferiores a $3,3 \log \text{ufc g}^{-1}$ para o produto recém-fabricado, o que nos parece relativamente alto.

Tabela 6. Populações de bolores e leveduras, expressas em média [variação]* $\log \text{ufc g}^{-1}$, obtidas para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a $4 \pm 1^\circ \text{C}$.

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
T1	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,07[0,95–1,30] ^{aA}
T2	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,07[0,95–1,30] ^{aA}
T3	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	1,60[0,95–2,85] ^{aA}
T4	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,33[0,95–2,08] ^{aA}
T5	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,10[1,00–1,30] ^{aA}	1,24[0,95–1,48] ^{aA}
T6	0,95 ^{aA}	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	0,97[0,95–1,00] ^{aA}	1,79[0,95–3,45] ^{aA}
T7	0,95 ^{aA}	1,09[0,95–1,30] ^{aA}	1,11[1,00–1,48] ^{ba}	1,09[0,95–1,30] ^{abA}	1,71[1,48–1,95] ^{aA}
T8	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,87 [1,00–3,32] ^{ba}	2,19[1,48–3,30] ^{abB}

* Valores mínimos – máximos das populações obtidas para todas as amostras analisadas, n=3

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento ($p < 0,05$).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios ($p < 0,05$).

MORGADO e BRANDÃO (1998) desenvolveram queijo *petit-suisse* por ultrafiltração e observaram, também, em duas de oito repetições de seus ensaios, a presença de bolores e leveduras, após 28 dias de armazenamento refrigerado, justificando a presença devido ao manuseio e embalagem em copos de polietileno.

Ensaio preliminares em queijo *petit-suisse* (CARDARELLI e SAAD, 2003) revelaram populações de bolores e leveduras atingindo patamares superiores a 4 log ufc g⁻¹ aos 28 dias, para as duas formulações testadas (uma com 10% de inulina e outra com 10% de oligofrutose), estando reprovadas segundo a legislação para queijos de muito alta umidade (até 3,7 log ufc g⁻¹) (BRASIL, 1996). Valores inferiores ao limite da legislação foram obtidos até 21 dias de armazenamento. A possibilidade do ambiente de processamento ter apresentado uma carga contaminante elevada já havia sido levantada. Concluiu-se que o produto apresentou-se microbiologicamente adequado até 21 dias de armazenamento e que modificações no ambiente de processamento deveriam ser testadas a fim de se obter um produto seguro com uma vida de prateleira mais longa.

Outra possibilidade de contaminação poderia advir de algum dos ingredientes comum a todas as formulações. Sabe-se, entretanto, que o controle de bolores e leveduras é crítico para a manutenção da qualidade do queijo *petit-suisse* por até um mês (GUNGERICH e JANSEN, 1994 apud MORGADO e BRANDÃO, 1998). As soluções sugeridas, no presente trabalho, para minimizar a contaminação são o controle ainda mais rígido do ambiente de processamento e das contaminações das matérias-primas e do material de embalagem.

4.3. Parâmetros físico-químicos de pH, acidez titulável e umidade

4.3.1. pH e acidez titulável

A tabela 7 mostra os resultados dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez titulável e umidade dos queijos obtidos nos ensaios T1-T8, durante o armazenamento.

Os valores de pH decresceram durante o período de armazenamento; entretanto, a redução não pode ser correlacionada a viabilidade de *L. acidophilus*, *B. lactis* e *S. thermophilus*. Os valores mais baixos de pH foram obtidos para T8 (controle). Os diferentes ensaios mostraram diferenças significativas em cada período de armazenamento, mas nenhum comportamento específico pode ser estabelecido para os ensaios, além do comentado sobre o T8 (sempre o mais baixo).

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos, expressos em média [desvio padrão]*, obtidos para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4±1 °C.

Ensaio	Dias	pH	Acidez titulável (% ác. láctico p/v)	Umidade (%)
T1	1	4,49 [0,01] ^{abB}	0,54 [0,01] ^{aA}	61,54 [0,18] ^{bA}
	7	4,42 [0,01] ^{bcA}	0,58 [0,02] ^{aAB}	61,44 [0,10] ^{abA}
	14	4,43 [0,01] ^{bA}	0,59 [0,02] ^{aBC}	61,35 [0,13] ^{bA}
	21	4,40 [0,02] ^{bA}	0,61 [0,02] ^{aBC}	61,54 [0,13] ^{bA}
	28	4,41 [0,02] ^{dA}	0,63 [0,02] ^{aC}	61,45 [0,27] ^{bA}
T2	1	4,49 [0,01] ^{abB}	0,55 [0,01] ^{aA}	62,41 [0,10] ^{dA}
	7	4,40 [0,02] ^{bA}	0,58 [0,01] ^{aB}	62,27 [0,22] ^{cdA}
	14	4,41 [0,01] ^{bA}	0,59 [0,01] ^{aB}	62,20 [0,12] ^{cdA}
	21	4,42 [0,01] ^{bcA}	0,63 [0,02] ^{aC}	62,24 [0,22] ^{cA}
	28	4,39 [0,01] ^{cdA}	0,65 [0,01] ^{abD}	62,14 [0,12] ^{cA}
T3	1	4,64 [0,02] ^{abD}	0,57 [0,02] ^{abA}	61,65 [0,14] ^{bA}
	7	4,44 [0,02] ^{cdeC}	0,65 [0,02] ^{bB}	61,62 [0,18] ^{bA}
	14	4,43 [0,01] ^{bBC}	0,67 [0,01] ^{bBC}	61,66 [0,18] ^{bcA}
	21	4,41 [0,02] ^{bcAB}	0,68 [0,01] ^{bBC}	61,67 [0,19] ^{bcA}
	28	4,39 [0,01] ^{cdA}	0,68 [0,01] ^{bcC}	61,67 [0,11] ^{bcA}
T4	1	4,47 [0,00] ^{aD}	0,54 [0,00] ^{aA}	62,20 [0,19] ^{cdA}
	7	4,44 [0,01] ^{cdC}	0,58 [0,02] ^{aB}	62,24 [0,06] ^{dA}
	14	4,42 [0,01] ^{bBC}	0,59 [0,02] ^{aBC}	62,26 [0,24] ^{dA}
	21	4,40 [0,01] ^{bB}	0,62 [0,00] ^{aCD}	62,14 [0,23] ^{cA}
	28	4,37 [0,02] ^{bcA}	0,64 [0,01] ^{aD}	62,03 [0,27] ^{cA}
T5	1	4,65 [0,01] ^{bD}	0,55 [0,03] ^{aA}	61,72 [0,20] ^{bcA}
	7	4,47 [0,00] ^{ecC}	0,64 [0,00] ^{bB}	61,91 [0,20] ^{bcA}
	14	4,46 [0,01] ^{cC}	0,65 [0,01] ^{bB}	61,81 [0,13] ^{cdA}
	21	4,44 [0,01] ^{cB}	0,66 [0,01] ^{bB}	61,73 [0,09] ^{bcA}
	28	4,42 [0,01] ^{dA}	0,67 [0,00] ^{bB}	61,77 [0,20] ^{bcA}
T6	1	4,68 [0,01] ^{bD}	0,54 [0,01] ^{aA}	61,98 [0,13] ^{cA}
	7	4,47 [0,01] ^{deC}	0,65 [0,00] ^{bB}	62,14 [0,25] ^{cA}
	14	4,46 [0,02] ^{cBC}	0,65 [0,00] ^{bB}	61,86 [0,18] ^{cA}
	21	4,44 [0,01] ^{cAB}	0,65 [0,01] ^{abB}	61,87 [0,10] ^{bcA}
	28	4,41 [0,01] ^{dA}	0,68 [0,01] ^{bcC}	61,97 [0,12] ^{cA}
T7	1	4,50 [0,01] ^{abC}	0,58 [0,01] ^{abA}	60,90 [0,08] ^{aA}
	7	4,40 [0,01] ^{abB}	0,64 [0,02] ^{bB}	60,98 [0,15] ^{aA}
	14	4,38 [0,02] ^{aAB}	0,64 [0,02] ^{bB}	60,93 [0,10] ^{aA}
	21	4,36 [0,01] ^{aA}	0,64 [0,01] ^{aB}	60,77 [0,17] ^{aA}
	28	4,35 [0,01] ^{bA}	0,67 [0,02] ^{bB}	60,93 [0,17] ^{aA}
T8	1	4,47 [0,02] ^{aC}	0,60 [0,00] ^{cA}	66,81 [0,21] ^{eA}
	7	4,37 [0,00] ^{abB}	0,75 [0,01] ^{cB}	66,97 [0,11] ^{eA}
	14	4,37 [0,01] ^{abB}	0,76 [0,02] ^{cBC}	66,86 [0,20] ^{eA}
	21	4,35 [0,02] ^{abB}	0,79 [0,02] ^{cCD}	66,71 [0,29] ^{dA}
	28	4,29 [0,01] ^{aA}	0,82 [0,01] ^{dD}	66,70 [0,24] ^{dA}

* n= 3

A,B Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma coluna, para cada ensaio, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

a, b Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

Os resultados de pH encontrados nesta pesquisa estão bastante próximos aos de seis marcas comerciais de queijo *petit-suisse* relatados por VEIGA *et al.* (2000), na faixa de pH 4,42 a 4,52. Já MORGADO e BRANDÃO (1998) apresentam como padrões de qualidade, para queijo *petit-suisse*, adotados industrialmente, pH de 4,20 a 4,65.

Com relação à acidez titulável, resultado absolutamente esperado e óbvio ocorreu: houve variação significativa em todos os ensaios ao longo do tempo ($p < 0,05$), com valores em elevação, o que demonstra a relação evidente de antagonismo ao pH (tabela 7). Além disso, o ensaio T8 apresentou os valores mais elevados de acidez em todos os períodos de armazenamento. A avaliação de produtos comerciais realizada por VEIGA *et al.* (2000) demonstrou valores de acidez elevada e grande amplitude de variação entre elas. Esse comportamento foi justificado pela variação no tipo e quantidade de fermento láctico empregado e pela possibilidade de ocorrência de rápida fermentação da lactose em produtos com pequena variação nas datas de fabricação. Esses valores (50,5 a 102,7°D) encontrados pelos autores foram ligeiramente superiores aos encontrados nesta pesquisa (0,54 a 0,82% ácido láctico p/v).

A acidez aumentada, concomitantemente a uma diminuição dos valores de pH do queijo, é comumente observada nesses tipos de produtos lácteos (GONCU e ALPKENT, 2005). A redução dos valores de pH observada durante o armazenamento é um processo natural causado pela produção contínua de ácido láctico e outros ácidos orgânicos pela cultura *starter* e pelas culturas probióticas, como foi relatado em trabalhos anteriores de nosso grupo com queijo minas frescal (BURITI *et al.*, 2005a; BURITI *et al.*, 2005b). Geralmente a maior contribuição é atribuída à cultura *starter*, como, por exemplo, *S. thermophilus* e *Lactococcus* spp. (BADIS *et al.*, 2004). Os ácidos orgânicos produzidos e liberados por *S. thermophilus* no queijo, principalmente ácido láctico, são gerados a partir da fermentação da lactose (FOX *et al.*, 2000; ZISU e SHAH, 2003). Além disso, sabe-se que outras bactérias lácticas, como *L. acidophilus*, também produzem principalmente ácido láctico e as bifidobactérias produzem ácido acético mais láctico na proporção de 3:1 (SHAH, 2000 e 2001).

BURITI *et al.* (2005a), processando queijo minas frescal potencialmente probiótico, observaram um decréscimo do pH durante o armazenamento, atribuído, nesse caso, mais à pós-acidificação da cultura *starter* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e/ou *L. lactis* subsp. *cremoris*) presente do que à cepa probiótica adicionada (*L. acidophilus* LA5).

Por outro lado, MARUYAMA *et al.* (2006), em outra pesquisa do nosso grupo, enfatizou que a quantidade de ácido láctico produzido pela cultura *starter* *S. thermophilus* e

pelos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* não influenciou na redução do pH do queijo *petit-suisse* estudado durante o armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 21 dias.

Os resultados de acidez e pH, no presente trabalho, demonstram que a presença dos prebióticos em combinação com os probióticos pode resultar em produtos menos ácidos. No entanto, não foi desenvolvido queijo *petit-suisse* sem a adição de probióticos, para se poder avaliar isoladamente esse efeito. Obviamente, como o ensaio T8 proporcionalmente continha mais massa-base (queijo quark) do que os demais ensaios (tabela 1), a contribuição da maior acidez e menor pH desse ingrediente na formulação do controle resultaram em um produto com maior acidez e menor pH.

Segundo JAY (2000), na determinação da quantidade de ácidos orgânicos em alimentos, a acidez titulável é mais expressiva que o pH isolado, pois a medição do pH se dá pela concentração de íons de hidrogênio, e os ácidos orgânicos podem não estar completamente dissociados. Assim, a acidez titulável é considerada como o melhor indicador da quantidade de ácidos presente em alguns produtos alimentícios. Entretanto, os resultados de pH e acidez desta pesquisa não demonstram a vantagem de se utilizar o parâmetro de acidez preferencialmente ao pH, mas sim, que ambos foram úteis na avaliação da alteração na quantidade de ácidos no produto. Portanto, como a medição do pH é mais rápida e menos trabalhosa para a execução, poderia ser a única adotada para monitoramento do produto durante o armazenamento.

4.3.2. Umidade

A umidade apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios para todos os períodos, o que demonstra que a variação nas formulações refletiu neste parâmetro. Além disso, os maiores valores de umidade pertencem ao ensaio 8, que é o controle, naturalmente com teor de sólidos totais menor devido à diferença na formulação (tabela 1). Não houve variação da umidade ao longo do tempo. Os produtos comerciais analisados por VEIGA *et al.* (2000) apresentaram uma faixa de umidade de 70,51% a 66,88%, que é superior se comparada com a faixa de variação encontrada nesta pesquisa, 66,97% a 60,90%. MORGADO e BRANDÃO (1998) apresentam como padrões de qualidade, adotados industrialmente, umidade de 65,75% a 69,75%.

De acordo com a legislação brasileira, o queijo *petit-suisse* se encaixa na classificação de queijos de muito alta umidade (acima de 55%) (ANVISA, 2001),

não havendo regulamentação para o teor de umidade do queijo *petit-suisse* (BRASIL, 2000). Portanto, os resultados encontrados são aceitáveis.

4.4. Perfil de textura instrumental

O perfil de textura instrumental é de grande valia para se medir a textura de alimentos. Entretanto, deve-se ter cautela em aceitar seus resultados para propósitos não relacionados à comparação de produtos. A técnica é claramente imitativa do que acontece na boca; mas, além das diferenças já conhecidas entre testes com instrumentos e com seres humanos, as relações entre algumas características sensoriais e os resultados da análise do perfil de textura instrumental não são lineares e algumas das medições instrumentais para alimentos semi-sólidos podem não se correlacionar com testes sensoriais (ROSENTHAL, 1999). Para a ótima correlação com dados sensoriais, o alimento pode ter que ser testado instrumentalmente sob diferentes condições (SZCZESNIAK, 1987).

Nem todos os atributos avaliados pelo perfil de textura instrumental são válidos para todos os tipos de alimentos (GUNASERAKAN e AK, 2003). Pelo fato do queijo *petit-suisse* ser um produto semi-sólido, de consistência pastosa, o termo firmeza parece mais apropriado para designar a força necessária para a realização de determinada deformação, ao invés de dureza. Além disso, os parâmetros fraturabilidade e mastigabilidade não são aplicáveis, pelo mesmo motivo.

A tabela 8 apresenta os parâmetros de textura instrumental analisados na presente pesquisa: firmeza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade.

A presente pesquisa foi conduzida de forma a se terem padronizados parâmetros como umidade, teor de proteínas e gordura uniformes entre os ensaios testados, exceto para o controle. Todavia, variações na matéria-prima usada em maior proporção (o queijo quark, por sua vez obtido a partir da fermentação do leite pasteurizado tipo A), influenciaram a composição dos queijos obtidos em cada ensaio, como poder-se-á verificar no item 4.6. Assim, tais interferências não puderam ser controladas e, possivelmente, atuaram sobre os atributos de textura instrumental testados. Relata-se, por exemplo, que o teor de umidade mais elevado torna o queijo mais adesivo, menos firme e menos elástico, e que a redução no teor de gordura aumenta a firmeza e a elasticidade (BRYANT *et al.*, 1995).

Tabela 8. Parâmetros de textura instrumental, expressos em média [desvio padrão]*, obtidos para os queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4±1 °C.

Ensaio	Dias	Firmeza (N)	Adesividade (Ns)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade (N)
T1	1	1,82 [0,02] ^{abA}	1,48 [0,09] ^{bA}	0,859 [0,007] ^{aA}	0,386 [0,002] ^{bcdC}	0,635 [0,016] ^{aA}
	7	2,23 [0,03] ^{bB}	1,80 [0,11] ^{aB}	0,860 [0,008] ^{abA}	0,367 [0,009] ^{bB}	0,759 [0,010] ^{bB}
	14	2,26 [0,07] ^{abB}	1,92 [0,04] ^{aB}	0,863 [0,001] ^{aA}	0,355 [0,005] ^{cB}	0,769 [0,002] ^{bB}
	21	2,37 [0,01] ^{aBC}	2,15 [0,07] ^{aC}	0,865 [0,004] ^{bA}	0,332 [0,004] ^{cdA}	0,807 [0,019] ^{aC}
	28	2,46 [0,08] ^{aC}	2,14 [0,01] ^{aC}	0,870 [0,002] ^{bcA}	0,325 [0,000] ^{cA}	0,829 [0,003] ^{aC}
T2	1	2,20 [0,06] ^{cA}	2,12 [0,08] ^{dA}	0,846 [0,011] ^{aA}	0,384 [0,007] ^{bcC}	0,844 [0,023] ^{dA}
	7	3,13 [0,10] ^{eB}	3,49 [0,08] ^{eB}	0,848 [0,003] ^{aAB}	0,372 [0,001] ^{bB}	1,162 [0,018] ^{fB}
	14	3,55 [0,10] ^{fC}	4,50 [0,21] ^{aC}	0,857 [0,004] ^{aAB}	0,350 [0,004] ^{cA}	1,246 [0,018] ^{fC}
	21	3,81 [0,13] ^{cdD}	4,97 [0,08] ^{fD}	0,863 [0,006] ^{abB}	0,346 [0,006] ^{dA}	1,319 [0,021] ^{eD}
	28	3,86 [0,05] ^{eD}	5,12 [0,21] ^{fD}	0,860 [0,003] ^{aAB}	0,344 [0,004] ^{dA}	1,319 [0,020] ^{fD}
T3	1	1,80 [0,07] ^{abA}	1,74 [0,10] ^{cA}	0,856 [0,005] ^{aA}	0,396 [0,002] ^{cdD}	0,699 [0,010] ^{bcA}
	7	2,02 [0,07] ^{abB}	1,93 [0,07] ^{abA}	0,858 [0,004] ^{abAB}	0,366 [0,005] ^{bC}	0,714 [0,008] ^{aA}
	14	2,20 [0,04] ^{aBC}	2,51 [0,08] ^{aB}	0,860 [0,004] ^{aAB}	0,345 [0,003] ^{cB}	0,719 [0,010] ^{aA}
	21	2,34 [0,12] ^{aC}	2,50 [0,05] ^{bB}	0,855 [0,001] ^{aB}	0,330 [0,003] ^{cA}	0,807 [0,017] ^{aB}
	28	2,63 [0,04] ^{bD}	2,55 [0,10] ^{bB}	0,865 [0,001] ^{bC}	0,322 [0,005] ^{cA}	0,866 [0,009] ^{bC}
T4	1	1,93 [0,09] ^{bA}	1,52 [0,02] ^{bA}	0,855 [0,003] ^{aA}	0,392 [0,003] ^{bD}	0,737 [0,014] ^{cA}
	7	2,44 [0,11] ^{cB}	2,13 [0,02] ^{bcB}	0,857 [0,004] ^{abA}	0,359 [0,002] ^{bC}	0,878 [0,012] ^{dB}
	14	2,56 [0,08] ^{cdB}	2,63 [0,14] ^{aC}	0,867 [0,002] ^{aB}	0,344 [0,005] ^{cB}	0,881 [0,016] ^{dB}
	21	2,81 [0,10] ^{bcC}	3,00 [0,07] ^{cdD}	0,867 [0,002] ^{bcB}	0,341 [0,001] ^{cdB}	0,964 [0,018] ^{cC}
	28	3,04 [0,01] ^{cdD}	3,13 [0,05] ^{cdD}	0,865 [0,001] ^{bB}	0,322 [0,003] ^{cA}	0,974 [0,009] ^{cC}
T5	1	1,70 [0,04] ^{aA}	1,66 [0,09] ^{bcA}	0,856 [0,003] ^{aA}	0,398 [0,004] ^{dD}	0,676 [0,014] ^{abA}
	7	2,25 [0,02] ^{bcB}	2,25 [0,07] ^{cB}	0,856 [0,008] ^{abA}	0,359 [0,005] ^{bC}	0,806 [0,010] ^{bB}
	14	2,48 [0,07] ^{cc}	2,44 [0,04] ^{aC}	0,859 [0,001] ^{aAB}	0,351 [0,005] ^{cbC}	0,819 [0,013] ^{bB}
	21	2,50 [0,07] ^{aC}	2,47 [0,02] ^{bcC}	0,865 [0,005] ^{abAB}	0,340 [0,008] ^{cdAB}	0,871 [0,018] ^{bC}
	28	2,56 [0,09] ^{abC}	2,63 [0,04] ^{bD}	0,870 [0,002] ^{bcB}	0,328 [0,004] ^{cA}	0,875 [0,015] ^{bC}
T6	1	1,92 [0,10] ^{bA}	1,65 [0,08] ^{bcA}	0,859 [0,002] ^{aA}	0,387 [0,004] ^{bcdD}	0,740 [0,020] ^{cA}
	7	2,33 [0,07] ^{bcB}	2,26 [0,11] ^{cB}	0,860 [0,007] ^{abAB}	0,361 [0,003] ^{bC}	0,837 [0,019] ^{bB}
	14	2,76 [0,04] ^{dC}	3,14 [0,02] ^{aC}	0,862 [0,003] ^{aAB}	0,343 [0,005] ^{cB}	0,950 [0,010] ^{eC}
	21	3,01 [0,02] ^{bD}	3,33 [0,08] ^{dCD}	0,867 [0,001] ^{bcB}	0,339 [0,002] ^{cdB}	1,021 [0,001] ^{dD}
	28	3,19 [0,05] ^{dE}	3,60 [0,17] ^{dD}	0,875 [0,004] ^{cC}	0,330 [0,002] ^{cA}	1,052 [0,016] ^{dD}
T7	1	1,71 [0,05] ^{aA}	1,25 [0,09] ^{aA}	0,865 [0,006] ^{aA}	0,378 [0,007] ^{bC}	0,647 [0,017] ^{aA}
	7	2,38 [0,05] ^{bcB}	2,24 [0,06] ^{cB}	0,865 [0,006] ^{bA}	0,333 [0,009] ^{aB}	0,729 [0,011] ^{abB}
	14	2,43 [0,11] ^{bcB}	2,61 [0,13] ^{aC}	0,878 [0,009] ^{aAB}	0,305 [0,007] ^{bA}	0,739 [0,020] ^{abB}
	21	2,43 [0,11] ^{aB}	2,61 [0,14] ^{bC}	0,878 [0,004] ^{dAB}	0,305 [0,007] ^{bA}	0,794 [0,021] ^{aC}
	28	2,95 [0,02] ^{cc}	3,31 [0,13] ^{cdD}	0,887 [0,003] ^{dB}	0,294 [0,003] ^{bA}	0,866 [0,010] ^{bD}
T8	1	1,92 [0,08] ^{bA}	1,60 [0,05] ^{bcA}	0,858 [0,004] ^{aA}	0,361 [0,005] ^{aC}	0,739 [0,013] ^{cA}
	7	2,90 [0,03] ^{dB}	2,57 [0,13] ^{dB}	0,866 [0,001] ^{bB}	0,321 [0,003] ^{aB}	0,923 [0,010] ^{eB}
	14	3,27 [0,05] ^{ec}	3,34 [0,06] ^{aC}	0,873 [0,003] ^{aC}	0,286 [0,003] ^{aA}	0,982 [0,011] ^{ec}
	21	3,70 [0,06] ^{cdD}	3,82 [0,01] ^{eD}	0,876 [0,001] ^{cdC}	0,285 [0,007] ^{aA}	1,034 [0,010] ^{dD}
	28	3,94 [0,01] ^{eE}	4,22 [0,07] ^{eE}	0,877 [0,001] ^{cC}	0,277 [0,001] ^{aA}	1,088 [0,005] ^{eE}

* n= 5

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma coluna, para cada ensaio, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

De maneira geral, os parâmetros de textura avaliados variaram entre os diferentes ensaios e ao longo do tempo. As Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 mostram a evolução da textura entre os ensaios e ao longo do tempo.

Sabe-se que os parâmetros de textura instrumental não são estáveis durante a vida de prateleira do queijo *petit-suisse*, fato esse observado em ensaios preliminares realizados (CARDARELLI *et al.*, 2003). O mesmo fato foi constatado nos ensaios descritos no presente trabalho.

Figura 6 – Evolução da firmeza ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.

Os ensaios que receberam inulina (T2, T4, T6, T7), em qualquer das proporções, apresentaram firmeza mais elevada em relação aos demais ensaios (exceto T8 - controle). Sabe-se que a inulina pode interferir na textura de produtos alimentícios, uma vez que baixas concentrações desse ingrediente resultam em um aumento significativo de viscosidade, enquanto que altas concentrações (40-45%) formam um gel firme, mas com sensação cremosa semelhante à oferecida pelos lipídios (MURPHY, 2001). Com relação ao T8, ressalta-se, novamente, que em função da diferença na formulação, tal ensaio apresentava, proporcionalmente, mais gelatina e goma xantana, agentes emulsionantes e espessantes e, portanto, esse produto tem características de textura modificadas em relação aos demais ensaios, devido a essa presença.

A firmeza aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao longo do tempo para todos os ensaios e os maiores valores foram obtidos aos 28 dias de armazenamento para

os ensaios T2 (contendo apenas inulina) e T8 (controle) (figura 5). O aumento da firmeza ao longo do tempo pode ser devido ao efeito do abaixamento de temperatura e da interação entre os componentes da formulação, associada ao baixo pH do produto (GONZÁLEZ *et al.*, 1998).

O efeito do pH na firmeza pode ser denotado a partir da correlação entre esses parâmetros para cada ensaio, considerando todos os períodos de armazenamento, conforme mostra a tabela 9. A relação foi antagônica, assim, à medida que o pH diminuiu, a firmeza aumentou.

Tabela 9. Coeficientes de correlação entre pH e firmeza para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 0,01% ($p < 0,00001$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Coeficiente de correlação	-0,89	-0,85	-0,87	-0,95	-0,91	-0,92	-0,90	-0,93

A interferência da composição dos queijos sobre a firmeza foi estatisticamente significativa (R^2 múltiplo=0,929; $p=0,009$; $F_{(3,4)}=17,465$) quando se procedeu à análise de regressão múltipla envolvendo o teor de gordura ($\beta=1,47$; $p=0,017$), o teor de carboidratos ($\beta=5,74$; $p=0,06$) e o teor de proteína ($\beta=4,94$; $p=0,06$). Os teores de gordura e de proteína influenciaram positivamente na firmeza, enquanto o teor de carboidratos, negativamente. KONUKLAR *et al.* (2004) já relataram que a composição dos queijos pode estar intimamente ligada aos parâmetros de textura instrumental, quando estudaram o uso de hidrocolóides na fabricação de queijo Cheddar. Os valores de dureza obtidos pelos autores a partir da análise do perfil de textura aumentaram com o aumento no teor de gordura e de proteína e decresceram com o aumento teor de umidade. Na presente pesquisa, o teor de umidade não pode ser correlacionado com a dureza, embora saiba-se que a umidade nos queijos atue fornecendo plasticidade e seja um fator importante para a determinação da textura. Essa interferência só confirma o comportamento de firmeza apresentado pelo T8 em relação aos demais.

A adesividade, apresentada em módulo na tabela 8 (pois é uma força medida quando o pistão do texturômetro está retornando de seu movimento de compressão), foi significativamente diferente ($p < 0,05$) também entre os ensaios e ao longo do tempo. A figura 7 mostra, graficamente, o comportamento deste parâmetro. Novamente, os maiores valores foram os do ensaio T2 e os dos

ensaios que receberam quaisquer proporções de inulina. Os referidos ensaios apresentaram adesividade mais elevada, em relação aos demais ensaios, exceto o controle (T8). A interferência da composição dos queijos sobre a adesividade foi estatisticamente significativa (R^2 múltiplo=0,910; $p=0,015$; $F_{(3,4)}=13,396$) quando se procedeu à análise de regressão múltipla, envolvendo o teor de gordura ($\beta=1,35$; $p=0,032$), o teor de carboidratos, ($\beta=6,98$; $p=0,004$) e o teor de proteína ($\beta=6,04$; $p=0,005$). Os teores de gordura e de proteína influenciaram positivamente na adesividade, enquanto o teor de carboidratos, negativamente.

Figura 7. Evolução da adesividade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.

O efeito do pH na adesividade também pode ser denotado a partir da correlação entre esses parâmetros para cada ensaio, considerando todos os períodos de armazenamento, conforme mostra a tabela 10. Novamente, quanto menor o pH, maior a adesividade (em módulo).

Tabela 10. Coeficientes de correlação entre pH e adesividade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% ($p<0,01$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Coeficiente de correlação	-0,90	-0,82	-0,84	-0,93	-0,95	-0,89	-0,92	-0,91

Figura 8. Evolução da elasticidade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.

A textura de muitos queijos muda quase continuamente após sua fabricação devido à ação proteolítica residual das enzimas, destacando-se a diminuição da elasticidade, especialmente em queijos que sofrem um processo de maturação (GUNASERAKAN e AK, 2003). Entretanto, os resultados da elasticidade nesta pesquisa foram os que menos variaram entre os ensaios e ao longo do tempo, dentre os parâmetros de textura instrumental avaliados, embora algumas diferenças significativas ($p < 0,05$) tenham sido detectadas, com destaque para o T7, em relação as demais e ao longo do tempo, apresentando maior elasticidade (figura 8).

O efeito do pH na elasticidade pode ser denotado a partir da correlação entre esses parâmetros para os ensaios nos quais havia combinações dos ingredientes prebióticos T4 ($r = -0,67$; $p = 0,01$); T5 ($r = -0,76$; $p = 0,001$); T6 ($r = -0,75$; $p = 0,001$); T7 ($r = -0,64$; $p = 0,001$) e também no ensaio-controle T8 ($r = -0,88$; $p = 0,00002$), considerando todos os períodos de armazenamento. Nos ensaios com ingredientes puros não houve associação significativa entre pH e elasticidade. Novamente, destaca-se que, quanto menor o pH, maior a elasticidade.

A coesividade também apresentou diferença significativa entre os ensaios para todos os períodos. O T8 apresentou os menores valores de coesividade em todos os períodos de armazenamento (figura 9). Os resultados de coesividade se correlacionaram positivamente com o teor de carboidratos ($r = 0,80$; $p = 0,02$) e negativamente com o teor de proteína ($r = -0,81$; $p = 0,02$), o que pode justificar os

menores valores encontrados para o T8. Houve variação ao longo do tempo para todos os ensaios, com valores em queda.

Figura 9. Evolução da coesividade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.

O efeito do pH na coesividade pode ser denotado a partir da correlação entre esses parâmetros para cada ensaio, considerando todos os períodos de armazenamento, conforme mostra a tabela 11. Neste caso, houve uma relação positiva entre pH e coesividade, assim, quanto menor o pH, menor a coesividade.

Tabela 11. Coeficientes de correlação entre pH e coesividade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% ($p < 0,01$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Coeficiente de correlação	0,81	0,72	0,93	0,89	0,97	0,88	0,96	0,88

A gomosidade apresentou diferenças significativas entre os ensaios ($p < 0,05$).

O T2, marcadamente, apresentou a maior gomosidade em todos os períodos de armazenamento e o crescimento mais acentuado também (figura 10).

O efeito do pH na gomosidade pode ser denotado, a partir da correlação entre esses parâmetros para cada ensaio, considerando todos os períodos de armazenamento, conforme mostra a tabela 12. Outra vez uma relação antagônica pode ser observada entre pH e gomosidade.

Figura 10. Evolução da gomosidade ao longo do armazenamento (1 a 28 dias) dos queijos, para os oito ensaios realizados.

Tabela 12. Coeficientes de correlação entre pH e gomosidade para os ensaios T1-T8 ao nível de significância de 1% ($p < 0,01$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Coeficiente de correlação	-0,93	-0,89	-0,79	-0,91	-0,95	-0,91	-0,87	-0,95

A interferência da composição dos queijos sobre a gomosidade foi estatisticamente significativa (R^2 múltiplo=0,837; $p=0,047$; $F_{(3,4)}=6,86$) quando se procedeu à análise de regressão múltipla, envolvendo o teor de gordura ($\beta=1,77$; $p=0,035$), o teor de carboidratos ($\beta=6,51$; $p=0,015$) e o teor de proteína ($\beta=5,12$; $p=0,023$). Os teores de gordura e de proteína influenciaram positivamente na gomosidade, enquanto o teor de carboidratos, negativamente.

Houve aumento da gomosidade dos queijos ao longo do tempo para todos os ensaios ($p < 0,05$). Preliminarmente, obteve-se o mesmo comportamento de crescimento ao longo do tempo para esse parâmetro de textura (CARDARELLI *et al.*, 2003).

De forma geral, o ingrediente que afetou mais intensamente os parâmetros de textura instrumental foi a inulina, resultando em produtos mais firmes, mais coesos e com maior adesividade e gomosidade. A presença da oligofrutose e do mel no *petit-suisse*, quando empregados como único ingrediente da mistura, resultaram em

menor firmeza, adesividade e gomosidade. O pH interferiu significativamente ($p < 0,01$) em todos os ensaios quanto aos atributos de firmeza (negativamente), adesividade (negativamente), coesividade (positivamente) e gomosidade (negativamente). No caso da elasticidade, a interferência foi negativa apenas nos ensaios T4, T5, T6, T7 e T8. As diferenças na composição quanto ao teor de gordura, proteína e carboidratos também interferiram nos parâmetros de textura, destacando, principalmente a diferença no experimento T8 (controle).

De acordo com os resultados dos parâmetros de textura instrumental, considera-se que a análise do perfil de textura é uma ferramenta adicional para se avaliar a influência dos ingredientes prebióticos na formulação de queijo *petit-suisse* probiótico ao longo do período de armazenamento refrigerado do produto, conforme previamente observado em resultados dos ensaios preliminares (CARDARELLI *et al.*, 2003). Entretanto, um estudo mais aprofundado desses efeitos poderia ser realizado futuramente, lançando-se mão das diferentes técnicas de avaliação sensorial discriminativa como, por exemplo, a análise descritiva, envolvendo a análise sensorial do perfil de textura, associadas à análise instrumental de textura. Nesse sentido, há vários trabalhos em literatura que citam a boa correlação entre textura instrumental e sensorial em queijos (TAMIME *et al.*, 1999; ANTONIOU *et al.*, 2000; BENEDITO *et al.*, 2000; BREUIL e MUELLENET, 2001; ADHIKARI *et al.*, 2003; KONUKLAR *et al.*, 2004).

4.5. Conteúdo de frutanos

A tabela 13 mostra os resultados de conteúdo de frutanos medidos após 1, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado.

Houve diferenças no conteúdo de frutanos entre os ensaios ($p < 0,05$), para todos os períodos de armazenamento. Os ensaios T1, T2 e T4 não apresentaram diferenças significativas entre si. Os resultados mais baixos foram encontrados para o T3. O baixíssimo conteúdo de frutanos em T3 pode ser atribuído à presença do mel como única variável, uma vez que esse ingrediente possui em torno de 4 a 5% de oligossacarídeos (KAJIWARA *et al.*, 2002). Esses compostos presentes no mel podem ser uma mistura de vários tipos, incluindo frutanos, enquanto os outros prebióticos adicionados, inulina e oligofrutose, são constituídos de, respectivamente, 92,5% e 94,9% de frutanos.

Tabela 13. Resultados de teor de frutanos, expressos em % médio [desvio padrão], dos queijos *petit-suisse* estudados durante armazenamento a 4 ± 1 °C.

Ensaio	Período de Armazenamento (dias)		
	1	21	28
T1	9,05 [0,04] ^{dA}	9,00 [0,01] ^{dA}	9,00 [0,09] ^{dA}
T2	9,20 [0,02] ^{dB}	9,03 [0,01] ^{dA}	8,95 [0,05] ^{dA}
T3	0,47 [0,02] ^{aA}	0,45 [0,04] ^{aA}	0,43 [0,08] ^{aA}
T4	9,09 [0,07] ^{dB}	9,05 [0,06] ^{dAB}	8,93 [0,01] ^{dA}
T5	4,97 [0,02] ^{bA}	4,97 [0,01] ^{bA}	4,95 [0,04] ^{bA}
T6	4,99 [0,04] ^{bB}	4,88 [0,07] ^{bA}	4,80 [0,08] ^{bA}
T7	6,52 [0,05] ^{cA}	6,53 [0,01] ^{cA}	6,52 [0,05] ^{cA}

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento ($p<0,05$) de um mesmo experimento.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes experimentos ($p<0,05$).

Os ensaios que receberam 5% de mel (T5 e T6) apresentaram conteúdos de frutanos também mais baixos (de 4,80 a 4,99%). O T7 apresentou conteúdo de frutanos abaixo de T1, T2 e T4, mas superior aos demais, pois inulina e oligofrutose representavam 2/3 da mistura. O perfil observado entre os ensaios para o dia 1 foi semelhante aos 21 e 28 dias de armazenamento.

Quanto aos valores ao longo do armazenamento, pode-se observar que houve uma redução significativa ($p<0,05$) para os ensaios T2, T4 e T6, com maiores proporções de inulina. Os demais ensaios não variaram significativamente ao longo do armazenamento, embora T3 tenha apresentado uma tendência de redução no conteúdo de frutanos.

Uma possível explicação para a redução no conteúdo de frutanos pode estar relacionada com a sua utilização pelos probióticos do produto. Conforme relatado por MAKRAS *et al.* (2005), frutanos do tipo inulina são conhecidos pelo efeito bifidogênico, isto é, são carboidratos preferenciais para as bifidobactérias. Entretanto, a multiplicação de outros gêneros da microbiota colônica, na presença dos frutanos, também tem sido relatada (DUNCAN *et al.*, 2003), incluindo cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* (KAPLAN e HUTKINS, 2000, MAKRAS *et al.*, 2005). KAPLAN e HUTKINS (2000) verificaram que 12 de 16 cepas de *Lactobacillus* fermentaram frutanos com grau de polimerização, de 2-4 (FOS). Por outro lado, o grau de polimerização da inulina varia geralmente de 3 a 60 (MURPHY, 2001), o que torna difícil a fermentação desse frutano por espécies de lactobacilos.

MAKRAS *et al.* (2005) estudaram 10 cepas de lactobacilos, quanto à capacidade para degradar oligofrutose e inulina. Os autores verificaram que apenas 2 cepas, *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2, foram capazes de degradar oligofrutose, enquanto apenas a cepa isolada de humano *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 multiplicou-se rapidamente, tanto em oligofrutose quanto em inulina.

Parece pouco provável que, no presente trabalho, esse consumo de frutanos por parte dos probióticos tenha sido seletivo para a inulina, pois a redução significativa observada não envolveu todos os ensaios que continham esse ingrediente (T2, T4 e T6, mas não no T7), e, particularmente, porque a inulina empregada nesta pesquisa possui uma mistura de polímeros com um grau de polimerização maior (≥ 10) do que a oligofrutose (<10), e, portanto, mais difícil de ser hidrolisada. ROBERFROID *et al.* (1998) monitoraram a degradação dos frutanos durante a fermentação, em temperatura ideal para os microrganismos intestinais, e relataram que o grupo contendo inulina com grau de polimerização >10 fermentou, em média, duas vezes mais lentamente do que o grupo com oligofrutose (grau de polimerização <10).

Outra hipótese é a de que a redução no pH possa ter levado a uma pequena hidrólise de inulina e oligofrutose. O fabricante informa que em temperaturas abaixo de 10°C e $\text{pH} \geq 4$, condições estas observadas no presente trabalho, pode haver hidrólise de ambos os produtos inferior a 10% (ORAFIT). Entretanto, as correlações entre os valores de pH e o conteúdo de frutanos foram não significativas para todos os ensaios ($p>0,05$) (tabela 14).

Tabela 14. Coeficientes de correlação entre conteúdo de frutanos e pH para os ensaios T1-T7, calculados com resultados médios entre os períodos de armazenamento.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Coeficiente de correlação	$r = 0,98$	$r = 0,98$	$r = 0,88$	$r = 0,89$	$r = 0,49$	$r = 0,79$	$r = -0,54$
Nível de probabilidade	$p = 0,12$	$p = 0,12$	$p = 0,32$	$p = 0,30$	$p = 0,67$	$p = 0,42$	$p = 0,64$

Portanto, novos estudos são sugeridos para se explicarem as causas da redução significativa no conteúdo de frutanos, incluindo-se o preparo de queijo *petit-suisse* contendo as culturas bacterianas individualmente; empregando-se o mesmo lote de queijo quark para as diferentes combinações de frutanos ou, ainda, padronizando o mesmo valor de pH inicial.

Quanto à concentração mínima de frutanos para promoção dos efeitos prebióticos, observa-se que não há consenso entre os vários trabalhos com humanos, encontrados em literatura. Houve mudanças significativas na microbiota fecal humana, com o consumo de oligossacarídeos de chicória (3 a 15g dia⁻¹ durante algumas semanas) (ROBERFROID *et al.*, 1998; GIBSON, 1999; RAO, 1999). COUSSEMENT (1999) recomenda até 10 g de inulina por porção de alimento. Já 4-5 g dia⁻¹ de frutanos são considerados eficientes para estimular a multiplicação das bifidobactérias (ROBERFROID, 1999; RAO, 2001; MANNING e GIBSON, 2004).

Tomando por base as pesquisas citadas, conclui-se que, para todos os ensaios estudados, os queijos *petit-suisse* estudados no presente trabalho podem ser considerados prebióticos durante 28 dias de armazenamento refrigerado, desde que a porção diária seja de 100g, exceto o T3 (10% de mel), contendo apenas de 0,43 a 0,47 g de frutanos por 100g de queijo *petit-suisse*.

4.6. Composição centesimal

A tabela 16 mostra os resultados de composição centesimal para os oito ensaios, expressos no extrato seco e na matéria úmida, mas estatisticamente analisados apenas para os resultados expressos no extrato seco.

Houve variação significativa de gordura entre os ensaios, sendo o T8 maior do que todos os outros ($p < 0,05$) (Tabela 16) Pode-se explicar essa variação devido aos diferentes lotes de queijo quark empregados no processamento dos ensaios, conforme mostra a tabela 15, e devido à diferença na formulação do controle (ensaio T8) em relação aos demais ensaios. O motivo para a variação nos teores de gordura do queijo quark foi a variação no teor de gordura do leite desnatado empregado no processamento dos diferentes lotes de queijo Quark. Muito embora a legislação apresente o limite de 0,5% de gordura para leite pasteurizado tipo A desnatado (BRASIL, 2002), a análise de vários lotes de leite mostrou uma variação bastante grande nesse componente, numa faixa de 0,47 a 1,5% em 5 lotes analisados num período de 30 dias.

Tabela 15. Teor de gordura, proteína, cinzas, umidade e carboidratos totais¹ (média $\pm$ desvio padrão)² obtidos para os queijos quark – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT) após 1 dia de armazenamento sob refrigeração ($4\pm 1^\circ\text{C}$).

Análises	Quark utilizado nos ensaios			
	1, 2 e 4	3, 5 e 6	7	8
Gordura ES (%)	14,87 [0,07]	14,51 [0,06]	10,18 [0,14]	13,17 [0,03]
Proteína ES (%)	62,24 [0,25]	62,52 [0,29]	65,98 [0,07]	63,57 [0,01]
Cinzas ES (%)	4,79 [0,08]	4,80 [0,03]	4,84 [0,03]	4,82 [0,04]
Carboidratos totais ¹ ES (%)	18,10 [0,44]	18,17 [0,30]	19,00 [0,04]	18,44 [0,04]
Gordura MT (%)	3,46 [0,02]	3,54 [0,03]	2,39 [0,03]	3,24 [0,01]
Proteína MT (%)	14,50 [0,06]	15,24 [0,07]	15,47 [0,02]	15,64 [0,00]
Cinzas MT (%)	1,11 [0,02]	1,17 [0,01]	1,13 [0,01]	1,19 [0,01]
Carboidratos totais ¹ MT (%)	4,22 [0,10]	4,43 [0,07]	4,46 [0,01]	4,54 [0,01]
Umidade (%)	76,71 [0,24]	75,63 [0,47]	76,55 [0,42]	75,40 [0,27]

¹ Calculado por diferença – inclui fibras

² Duplicata

A diferença na formulação do controle em relação aos demais ensaios também justifica os resultados de carboidratos totais, cinzas e proteína, sendo significativamente diferente apenas o controle dos demais (proteína e cinzas maiores, e carboidratos totais menores) ($p < 0,05$).

Todos os resultados de composição centesimal refletem principalmente as variações encontradas nos diferentes lotes do queijo Quark usado como matéria-prima e também as diferenças no ensaio-controle em relação às demais.

Apenas para finalidade de comparação, VEIGA *et al.* (2000) encontraram variação nos teores de gordura (de 4,47% a 6,22%) e proteína (de 6,59% a 8,88%), na matéria total de queijos *petit-suisse* obtidos do comércio. Os resultados de gordura foram superiores enquanto os de proteína inferiores aos obtidos na presente pesquisa. Isso pode ser demonstrado pela relação proteína/gordura encontrada no trabalho dos autores já citados (de 0,99 a 1,74), enquanto nesta pesquisa, essa relação variou de 2,42 a 2,70. Já MORGADO e BRANDÃO (1998) apresentam como padrões de qualidade, adotados industrialmente, para teor de gordura no queijo *petit-suisse*, de 5,4% a 7,0% na matéria total.

Tabela 16. Teor de gordura, proteína, cinzas e carboidratos totais¹ (média $\pm$ desvio padrão)² obtidos para os queijos petit-suisse no produto final – extrato seco (ES) e matéria úmida (MT), após 1 dia de armazenamento sob refrigeração ($4\pm 1^\circ\text{C}$).

Ensaio	Gordura	Proteína	Cinzas	Carboidratos totais ¹
Extrato seco (%)				
T1	9,67 [0,10] ^b	23,95 [0,24] ^a	2,11 [0,01] ^a	64,27 [0,14] ^a
T2	9,76 [0,08] ^b	24,65 [0,14] ^a	2,13 [0,07] ^a	64,46 [0,37] ^a
T3	9,10 [0,18] ^{ab}	24,09 [0,34] ^a	2,35 [0,02] ^a	64,46 [0,07] ^a
T4	9,87 [0,06] ^b	24,26 [0,16] ^a	2,12 [0,02] ^a	63,76 [0,14] ^a
T5	9,25 [0,12] ^{ab}	24,27 [0,27] ^a	2,27 [0,04] ^a	64,21 [0,43] ^a
T6	9,16 [0,07] ^{ab}	24,49 [0,30] ^a	2,18 [0,03] ^a	64,18 [0,44] ^a
T7	9,06 [0,07] ^a	24,42 [0,25] ^a	2,12 [0,03] ^a	64,40 [0,60] ^a
T8	11,54 [0,05] ^c	29,91 [0,08] ^b	2,71 [0,10] ^b	55,84 [0,00] ^b
Matéria total (%)				
T1	3,72 [0,05]	9,21 [0,01]	0,81 [0,01]	24,72 [0,09]
T2	3,67 [0,03]	8,89 [0,13]	0,80 [0,03]	24,23 [0,23]
T3	3,49 [0,11]	9,24 [0,13]	0,90 [0,01]	24,72 [0,04]
T4	3,73 [0,02]	9,17 [0,02]	0,80 [0,01]	24,10 [0,09]
T5	3,54 [0,08]	9,29 [0,10]	0,87 [0,02]	24,58 [0,27]
T6	3,48 [0,04]	9,31 [0,11]	0,83 [0,01]	24,40 [0,27]
T7	3,54 [0,06]	9,55 [0,30]	0,83 [0,01]	25,18 [0,36]
T8	3,83 [0,02]	9,93 [0,03]	0,90 [0,03]	18,53 [0,00]

¹ Calculado por diferença – inclui fibras

² Triplicata

³ Análise de variância e Teste de Tukey ($p < 0,05$), letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os ensaios ($p < 0,05$)

4.7. Avaliação sensorial

4.7.1. Aceitabilidade

Probióticos e prebióticos são ingredientes alimentícios ainda pouco familiares do consumidor e, conseqüentemente, pouco se sabe sobre a aceitabilidade dos mesmos pelo consumidor (LUCKOW e DELAHUNTY, 2004).

Os resultados dos testes de aceitabilidade encontram-se na tabela 17. Não houve diferença significativa ao nível de 5% ($p > 0,05$) entre os diferentes ensaios em relação à aceitabilidade das amostras, exceto aos 28 dias de armazenamento refrigerado. Após 28 dias de armazenamento, a mais baixa aceitação foi a do T8 (controle), enquanto T1, T2, T4, T5, T6 e T7 não diferiram, embora a aceitação média mais alta tenha sido observada para T1 (10% de oligofrutose). T3 não apresentou um bom desempenho e foi o segundo menos aceito. Os resultados variaram de 'gostei ligeiramente' a 'gostei moderadamente', o que significa que todas as combinações dos produtos foram sensorialmente aceitas.

As diferenças em aceitação durante o armazenamento foram estatisticamente significativas apenas para os ensaios contendo 10% de oligofrutose (T1), 10% de inulina (T2) e 5% de oligofrutose mais 5% de inulina (T4). T1 e T2 mostraram aceitação significativa maior após 28 dias de armazenamento do que após 7, 14 e 21 dias. T4 foi mais aceito após 21 e 28 dias de armazenamento do que após 7 e 14 dias. Entretanto, a pontuação média mais alta foi obtida com T1 (10% de oligofrutose), atingindo 7,43 após 28 dias de armazenamento. Além disso, os resultados não significativos para um mesmo ensaio (T3, T5, T6, T7 e T8) mostraram aceitação estável ou ligeiramente crescente durante o armazenamento.

Embora sem diferenças significativas, a sequência de aceitação média geral da mais alta para a mais baixa entre os ensaios foi $T4 > T1 > T5 > T6 > T7 > T2 > T3 > T8$. Entretanto, surge uma questão: porque os consumidores avaliaram diferentemente os ensaios?

O objetivo da maioria das pesquisas quantitativas com consumidores para o desenvolvimento de alimentos é determinar a reação afetiva do consumidor a novos produtos ou produtos reformulados. O grau de aceitabilidade do consumidor é medido freqüentemente, solicitando-se que ele avalie o quanto gosta de um produto, de maneira geral, usando uma escala hedônica de nove pontos (POPPER *et al.*, 2004). Sabe-se que testes afetivos (como o teste de aceitabilidade) são interessantes para responder o quanto um produto tem de potencial comercial, especialmente quando os consumidores são usados como provadores.

O pH significativamente mais alto em um dos ensaios estudados por BURITI *et al.* (2005a), processando queijo minas frescal potencialmente probiótico, foi relacionado a uma maior preferência (embora não significativa) na análise sensorial. Sabe-se que algumas das substâncias produzidas pelas bactérias lácticas,

principalmente ácidos orgânicos, são capazes de reduzir o pH dos queijos e alterar as características organolépticas do produto (SHAH, 2000; FOX *et al.*, 2000). Comportamento similar foi observado com o queijo *petit-suisse* nesta pesquisa; entretanto as diferenças no pH não foram tão pronunciadas. Ademais, o T8 (controle) mostrou os mais baixos valores de pH entre os ensaios durante o armazenamento e a mais baixa aceitação também.

A validade dos testes hedônicos está intimamente associada à uniformidade e consistência da amostragem de consumidores (KÖSTER, 2002 e 2003). Há subjetividade na avaliação sensorial com consumidores como provadores. KÖSTER *et al.* (2002) comentaram que ‘não se pode esperar que a mesma população terá a mesma opinião, diante de um mesmo grupo de amostras em duas ocasiões diferentes’. Nesta pesquisa, os consumidores mostraram um certo grau de consistência nas pontuações entre as sessões (de 7 até 28 dias); entretanto, o painel não foi o mesmo entre as sessões (apenas alguns consumidores participaram repetidamente das sessões). Três ensaios (T1, T2 e T4) apresentaram diferenças significativas durante o armazenamento ($p < 0,05$). Esse resultado pode ser explicado pela familiaridade dos consumidores com o produto, ao longo do tempo, a despeito do grau de ‘novidade’ de se usar ingredientes prebióticos. Outros autores relataram resultados similares previamente (KÖSTER, 2003; HERSLETH *et al.*, 2005).

Embora tenha sido demonstrada relativa consistência nas pontuações entre as sessões, alguma variação ocorreu entre os ensaios (tabela 17). T1 apresentou os julgamentos mais consistentes (menor desvio padrão) e as maiores aceitações após 7 e 28 dias de armazenamento (embora significativamente apenas para 28 dias). HERSLETH *et al.* (2005), trabalhando com queijo duro e semi-duro, relataram que as amostras que forneceram os julgamentos mais consistentes foram as de maior aceitação também.

Sabe-se que os locais onde os testes sensoriais com alimentos são aplicados podem influenciar os resultados finais. O uso de áreas mais controladas, como por exemplo, laboratório, pode evitar a interferência da maioria das variáveis ambientais, de estímulo e, em certo grau, de interação social. Os argumentos a favor do uso de testes de laboratório são permitir que o foco se concentre nas características sensoriais dos produtos, sem influência de variáveis externas relacionadas ao ambiente de alimentação ou a padrões sociais (HERSLETH *et al.*, 2005). Entretanto, algumas medidas da preferência

dos alimentos em laboratório demonstraram ser pobres preditores de consumo (CARDELLO *et al.*, 2000; KOSLOWSKA *et al.*, 2003). Além disso, HERSLETH *et al.* (2005) mostraram que a mudança no ambiente e o grau de interação social durante o teste com consumidores não produziu efeito significativo nas avaliações hedônicas para queijos duro e semi-duro. Testes sensoriais mais próximos à situação real de consumo poderiam ser usados para estudar o comportamento do consumidor de queijo *petit-suisse*, especialmente modificando o local de teste para se confirmar ou não esta possível influência.

Contudo, poucos estudos têm abordado o queijo *petit-suisse* recentemente, e se torna bastante difícil fazer comparações, de maneira conclusiva, sobre a aceitação sensorial do queijo *petit-suisse* potencialmente simbiótico desenvolvido nesta pesquisa. Em um desses estudos, VEIGA e VIOTTO (2000) produziram queijo *petit-suisse* com polpa de morango, utilizando ultrafiltração e a aceitabilidade sensorial usando painel de consumidores variou entre ‘gostei ligeiramente’ e ‘gostei muito’. Mesmo esses resultados parecem não ser diferentes dos resultados desta pesquisa; entretanto, eles usaram diferentes parâmetros na formulação em comparação com esta pesquisa. De acordo com os autores, o queijo *petit-suisse* pode atingir consumidores adultos, devido à faixa etária dos provadores na sua pesquisa (idades entre 17 e 40 anos).

MORGADO e BRANDÃO (1998) também desenvolveram queijo *petit-suisse* com polpa de morango, usando ultrafiltração. Os pesquisadores aplicaram testes de aceitabilidade (com escala hedônica de nove pontos), com 500 provadores não-treinados, estudantes da escola secundária (11 a 14 anos de idade). Um número expressivo de provadores, 94,4%, escolheu entre ‘gostei moderadamente’ e ‘gostei muitíssimo’, sendo que 35,3% consideraram o produto excelente (‘gostei muitíssimo’), 40,8% muito bom (‘gostei muito’), 18,3% bom (‘gostei moderadamente’) e 5,6% selecionaram outros valores na escala hedônica. Esses resultados são melhores do que os encontrados na presente pesquisa. Considerando esses estudos e a idade dos provadores na presente pesquisa (variou de 18 a 60 anos), pode-se concluir que consumidores de diferentes idades realmente apreciam queijo *petit-suisse* e os pesquisadores na área de desenvolvimento de alimentos podem, possivelmente, atingir o mercado adulto e aumentar o consumo de queijo *petit-suisse*.

Tabela 17. Resultados de aceitabilidade sensorial dos queijos *petit-suisse* estudados, expressos por média [desvio padrão] (n=35) da escala de pontos de 1 a 9.

Ensaio	p ¹	Média por ensaio	Período de armazenamento (dias)			
			7	14	21	28
T1	0,2681	6,97 [0,97]	6,66 [1,16] ^{aA}	6,83 [1,07] ^{aA}	6,97 [0,89] ^{aA}	7,43 [0,56] ^{cB}
T2	0,6553	6,53 [0,98]	6,20 [1,13] ^{aA}	6,37 [1,06] ^{aA}	6,54 [0,78] ^{aA}	7,00 [0,69] ^{abCB}
T3	0,5068	6,42 [1,25]	6,29 [1,62] ^{aA}	6,14 [1,40] ^{aA}	6,49 [1,12] ^{aA}	6,77 [0,55] ^{abA}
T4	0,3215	6,99 [1,22]	6,54 [1,56] ^{aA}	6,74 [1,34] ^{aA}	7,31 [0,87] ^{aB}	7,34 [0,80] ^{cB}
T5	0,7105	6,79 [1,38]	6,49 [1,15] ^{aA}	6,71 [1,58] ^{aA}	6,97 [1,36] ^{aA}	7,00 [1,39] ^{abCA}
T6	0,3227	6,71 [1,56]	6,26 [1,77] ^{aA}	6,60 [1,52] ^{aA}	6,83 [1,71] ^{aA}	7,14 [1,06] ^{bcA}
T7	0,5890	6,66 [1,45]	6,23 [1,37] ^{aA}	6,66 [1,76] ^{aA}	6,74 [1,40] ^{aA}	7,03 [1,12] ^{abCA}
T8	0,8779	6,39 [1,23]	6,17 [1,07] ^{aA}	6,23 [1,42] ^{aA}	6,54 [1,15] ^{aA}	6,63 [1,26] ^{aA}
Média por período			6,35 [1,37]	6,54 [1,41]	6,80 [1,21]	7,04 [1,00]
p ²			0,4804	0,2241	0,4658	0,5829

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas, na mesma linha, para cada ensaio, indicam as diferenças significativas observadas entre os períodos de armazenamento (p<0,05).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas, na mesma coluna, indicam as diferenças significativas observadas entre os diferentes ensaios (p<0,05).

¹ Falta de consenso entre os provadores para cada ensaio significativa se p<0,05

² Falta de consenso entre os provadores para cada período significativa se p<0,05

4.7.2. Associação entre aceitabilidade e textura instrumental

Deve-se ter em mente que a textura é resultado de estímulos multifatoriais e que a maioria das medições instrumentais tende a se concentrar em uma das propriedades do alimento. Portanto, não se espera assumir, necessariamente, a existência de qualquer relação entre a medição instrumental e a experiência sensorial (ROSENTHAL, 1999). Entretanto, um método instrumental que mostre alta correlação com uma ou mais medidas sensoriais é um bom candidato a prever tais propriedades sensoriais (BOWER, 2000). Diante dos resultados de aceitabilidade, que mostraram um aumento significativo dos valores, ao longo do tempo, para os ensaios T1, T2 e T4, e também o comportamento de aumento, ao longo do tempo para alguns parâmetros de textura instrumental, estudaram-se as possíveis correlações existentes entre aceitabilidade e textura instrumental (tabela 18).

Tabela 18. Coeficientes de correlação entre aceitabilidade e parâmetros de textura instrumental para os ensaios T1-T8, calculados com resultados médios entre os períodos de armazenamento.

Aceitabilidade x		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Firmeza	r	0,97	0,83	0,87	0,95	0,92	0,99	0,79	0,97
	p	0,03*	0,17	0,13	0,06*	0,08	0,02*	0,21	0,03*
Adesividade	r	0,81	0,83	0,38	0,96	0,91	0,95	0,94	0,93
	p	0,19	0,17	0,62	0,04*	0,09	0,05	0,06	0,07
Elasticidade	r	0,98	0,64	0,53	0,60	0,86	0,96	0,99	0,87
	p	0,02*	0,36	0,47	0,40	0,08	0,04	0,01*	0,13
Coesividade	r	-0,90	-0,75	-0,75	-0,44	0,93	-0,98	-0,98	-0,76
	p	0,10	0,25	0,25	0,16	0,07	0,02*	0,02*	0,24
Gomosidade	r	0,94	0,82	0,97	0,98	0,97	0,97	0,88	0,96
	p	0,06	0,18	0,04*	0,02*	0,03*	0,03*	0,12	0,04*

r = coeficiente de correlação

p= nível de probabilidade

* significativo ao nível de 5%

Constatou-se que, embora os coeficientes de correlação entre aceitabilidade e firmeza tenham apresentado um grau de associação de moderado (ensaio T7) a forte (todos os outros ensaios), conforme o critério adotado por MORTON *et al.* (1996) apud BOWER (2000), alguns ensaios não apresentaram significância nas correlações obtidas. Houve correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) apenas para os ensaios T1, T4, T6 e T8. Quanto aos demais parâmetros de textura, novamente apenas alguns dos ensaios apresentaram correlação significativa (observar os valores em negrito, correspondentes aos ensaios com correlação significativa e com aceitabilidade e textura significativos).

Sabe-se que a correlação pode ser aplicada quando uma medida instrumental rápida é usada para prever algum aspecto sensorial, comparando-a com as avaliações de um painel de provadores treinados. Essa atuação pode ser estendida incluindo-se medidas hedônicas e de preferência geradas por consumidores, o que é de grande valia para as indústrias alimentícias. Esse fato ocorre, em virtude destas poderem relacionar dados de um painel sensorial treinado e medições instrumentais diretamente com a percepção do consumidor e, assim, aumentar o potencial de venda do produto (BOWER, 2000).

Entretanto, dois problemas podem surgir. Um deles relaciona-se à possível falta de linearidade entre os parâmetros, o que pode invalidar a análise (MACFIE e HEDDERLEY, 1993). O outro relaciona-se ao fato de que respostas individuais podem diferir da média e os pesquisadores devem garantir que dados de consumidores desse tipo sejam representativos da população alvo (BOWER, 2000). Com respeito a esse último comentário, já se havia discutido previamente. Portanto, embora os resultados sinalizem uma possível associação entre a aceitabilidade dos consumidores e a textura instrumental, os estudos com correlação não se mostraram de todo favoráveis a essa conclusão.

4.7.3. Comparações entre os atributos sensoriais

Os pesquisadores em desenvolvimento de produto precisam saber não só o grau de aceitabilidade global, mas também o que os consumidores gostam ou desgostam no produto, e como esses atributos podem ser modificados para aumentar a aceitabilidade. Por essa razão, estudos freqüentemente incluem questões sobre os atributos do produto que podem determinar o grau de aceitação global e questões relacionadas com as propriedades sensoriais do alimento, tais como aroma, *flavour*, e textura (POPPER *et al.*, 2004). Mas discute-se se essas questões podem ser fontes de confusão (STONE e SIDEL, 1993).

Na presente pesquisa, considerando os atributos preferidos e não-preferidos, os provadores mencionaram, principalmente, dois atributos: sabor e textura (Figura 11). Empregando-se a média geral entre todos os quatro períodos de armazenamento (7, 14, 21 e 28 dias) e todos os oito ensaios, houve diferenças significativas entre as freqüências para preferidos e não-preferidos, para o atributo sabor (Pearson Qui-quadrado = 54,14; $p = 0,00000$) e para o atributo textura (Qui-quadrado = 19,78; $p = 0,006$).

As figuras 12 e 13 mostram as freqüências respectivamente para os atributos de sabor e textura entre todos os períodos de armazenamento e para os oito ensaios realizados.

Sabor foi quase sempre o atributo preferido, exceto para o T8. O T1 (10% de oligofrutose), T3 (10% de mel) e T5 (5% de oligofrutose mais 5% de mel) foram os mais mencionados como tendo sabor preferido, embora nenhum estudo adicional tenha sido feito para elucidar as razões desse comportamento.

Figura 11. Frequências para os atributos preferidos e não preferidos mencionados pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento e ensaios dos queijos estudados, onde os números sobre as barras correspondem ao número de vezes em que o atributo foi citado.

Sabe-se que a textura é considerada pelo consumidor como uma determinante da qualidade total e preferência (FOEGEDING *et al.*, 2003). Constatou-se que o atributo de textura foi o mais reprovado pelos consumidores, embora as contribuições individuais dos ensaios não tenham sido muito diferentes entre preferidos e não-preferidos. Uma possível explicação poderia ser que, no caso de mais de um produto analisado, questões sobre atributos perguntadas para o primeiro produto ainda tenham o potencial de influenciar as avaliações dos produtos analisados subsequente (POPPER *et al.*, 2004).

Para a maioria dos consumidores, a textura não é comentada, a menos que eles sejam questionados especificamente ou que a textura esteja inapropriada, as expectativas tenham sido violadas ou associação da textura a outras coisas, que não o alimento, sejam feitas (SZCZESNIAK, 2002). Nesse sentido, o queijo *petit-suisse* apresentou textura “arenosa” de forma geral em todos os ensaios. As causas da ‘arenosidade’ não foram investigadas, mas algumas possibilidades podem ser levantadas, dentre elas: a presença das sementes da polpa de morango, que, quando trituradas deixam esse efeito de ‘areia’; a interação entre os ácidos

produzidos pelos microrganismos durante o processamento do queijo quark e as micelas de caseína com o teor de gordura menor; e a homogeneização com uma combinação de gomas pouco apropriada para o tipo de produto. Ensaios futuros poderão sugerir modificações a fim de melhorá-lo, embora o emprego de métodos descritivos na análise sensorial seriam mais indicados para esse tipo de avaliação, conforme recomenda DUTKOSKY (1996). TÁRREGA e COSTELL (2005) comentaram que pode-se esperar que a adição de inulina poderia levar a alterações na percepção do *flavour* e da textura. Assim, os ensaios contendo esse ingrediente podem ter sofrido esse tipo de influência também.

Figura 12. Frequências para o atributo sabor preferido e não-preferido, mencionados pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento dos queijos estudados.

Embora ROHM (1990), baseado em vários estudos, tenha indicado que a textura do alimento seja individualmente o atributo dominante na preferência do consumidor por alimentos, o significado da textura é diferente entre as pessoas consideradas consumidores (GUNASEKARAN e AK, 2003). Talvez por essa razão, os resultados do atributo textura não tenham sido conclusivos em relação ao grau de preferência do consumidor, demandando mais estudos.

O sabor é de crucial importância em alimentos funcionais, e, de acordo com VERBEKE (2006), contar com a vontade do consumidor em comprometer o sabor para aceitar um alimento funcional em relação à saúde é uma opção

estratégica arriscada e altamente especulativa. Portanto, é fundamental a preocupação pela qualidade sensorial dos alimentos funcionais, associando o prazer de comer ao aspecto de saúde.

Figura 13. Frequências para o atributo de textura preferido e não-preferido, mencionado pelos consumidores em todos os períodos de armazenamento dos queijos estudados.

4.8. Otimização através da metodologia da superfície de resposta (RSM)

A finalidade última da RSM é a obtenção do produto mais adequado para as condições e objetivos propostos no desenvolvimento de um produto.

É difícil determinar a mistura de ingredientes ótima, quando muitas variáveis-resposta devem ser consideradas ao mesmo tempo. A mistura ótima para uma variável pode ser bem diferente daquela para outra variável. Deve-se, inicialmente, combinar as variáveis-resposta e escolher as mais críticas para a qualidade do produto (ELLEKJÆR *et al.*, 1996).

A seguir, as etapas para a otimização do queijo *petit-suisse* potencialmente simbiótico foram divididas, didaticamente, em três: obtenção dos modelos de regressão, validação dos modelos obtidos e otimização.

4.8.1. Obtenção dos modelos de regressão

Os modelos de regressão linear definem as relações quantitativas entre as variáveis (fatores de variação) e as respostas, cobrindo toda faixa experimental testada, assim como as interações que podem ocorrer.

Foram testados todos os modelos de regressão (linear, quadrático e cúbico especial), para todas as respostas de interesse, ao nível de significância de 5%, utilizando os resultados aos 21 dias de armazenamento. Justifica-se a escolha desse período, para a otimização, em função da exigência matemática da RSM, isto é, os resultados devem apresentar variância significativa e homogênea. Tal exigência não pode ser cumprida com o máximo tempo de armazenamento (28 dias), o qual seria a condição teoricamente mais desfavorável para a vida de prateleira, e, portanto, optou-se pela otimização aos 21 dias de armazenamento. A decisão do modelo mais adequado foi baseada na falta de ajuste e no coeficiente de determinação (R^2).

A tabela 19 apresenta os coeficientes dos modelos obtidos, calculados por regressão múltipla, a partir dos resultados experimentais de contagem das bactérias probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis*, do parâmetro de textura instrumental firmeza, do conteúdo de frutanos, do custo, no período de 21 dias de armazenamento, utilizando o programa *Statistica for Windows*, versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

A análise de variância (ANOVA) e testes *F* foram aplicados, para avaliar a falta de ajuste dos modelos de regressão e sua habilidade preditiva.

O coeficiente de determinação (R^2) representa a porcentagem de variação, explicada pelo modelo ajustado aos dados experimentais. Os resultados desse coeficiente indicaram excelente ajuste do modelo aos dados experimentais para a variável conteúdo de frutanos e para a firmeza e ajustes menores para as populações de *L. acidophilus* e *B. lactis*. Os custos dos ingredientes nas misturas propostas pelo delineamento experimental (ensaios T1 a T7) foram calculados com base nas informações fornecidas pelos fabricantes e os valores são apresentados como R\$ por Kg de produto, calculados com 1 dólar equivalente a R\$ 2,995.

Tabela 19. Coeficientes calculados por regressão múltipla e respectivos erros-padrão, para o modelo cúbico especial, a partir dos resultados experimentais de contagem das bactérias probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis*, do parâmetro de textura instrumental firmeza, do conteúdo de frutanos e do custo dos ingredientes prebióticos, nos queijos *petit-suisse* estudados.

Respostas	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₂	b ₁₃	b ₂₃	b ₁₂₃	R ²
<i>L. acidophilus</i>	6,60 (0,03)	6,67 (0,03)	6,50 (0,03)	-0,31 (0,13)	- (0,16)	0,39 (0,13)	-4,55 (0,88)	0,79
<i>B. lactis</i>	7,40 (0,03)	7,40 (0,031)	7,26 (0,03)	- (0,26)	-0,36 (0,16)	-0,50 (0,16)	3,30 (1,08)	0,73
Firmeza*	2,37 (0,05)	3,79 (0,05)	2,32 (0,05)	-1,07 (0,26)	0,65 (0,26)	- (0,26)	-9,41 (1,70)	0,98
Conteúdo de Frutanos	9,01 (0,03)	9,05 (0,03)	0,45 (0,04)	- (0,17)	0,98 (0,17)	0,52 (0,17)	5,29 (1,16)	1,00
Custo**	2,74	2,20	2,74	-	-	-	-	1,00

R² = coeficiente de determinação. Todas as respostas foram significativas através do teste F em nível de 5% (p<0,05), n=3, *n=5

** custo proporcional dos ingredientes

As tabelas 20 a 23 mostram, detalhadamente, as análises de variância dos modelos polinomiais cúbicos especiais ajustados aos resultados experimentais obtidos para a viabilidade de *L. acidophilus* e de *B. lactis*, para o parâmetro de textura instrumental firmeza e para o conteúdo de frutanos, respectivamente. Como os modelos linear e quadrático não foram suficientes para explicar os resultados, apresentando falta de ajuste significativa, aplicou-se o modelo cúbico especial, com resultados satisfatórios; as interações não significativas foram eliminadas para o ajuste do modelo (tabela 19).

Tabela 20. Análise de variância do modelo cúbico especial, ajustado aos dados experimentais da contagem da bactéria probiótica *L. acidophilus*, nos queijos *petit-suisse* estudados.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
Regressão	5	0,1231	0,0246	11,1296*	0,0001
Resíduo	15	0,0332	0,0022		
Falta de ajuste	1	0,0003	0,0003	0,1343	0,7195
Erro puro	14	0,0329	0,0024		
Total	20	0,1563	0,0078		
% variação explicada	78,77%				
% máxima de variação explicável	78,97%				

* Significante ao nível de 95% de probabilidade (p<0,05)

Portanto, os modelos apresentaram uma falta de ajuste (*lack of fit*) não significativa ao nível de 95% de probabilidade e ajustam-se aos resultados experimentais encontrados para as variáveis-resposta otimizadas. Também foi

possível confirmar-se a relação de dependência das variáveis-resposta à variação na proporção dos fatores usados nas misturas, pois, em ambos, o valor F calculado foi significativo ao nível de 95% de probabilidade.

Tabela 21. Análise de variância do modelo cúbico especial, ajustado aos dados experimentais da contagem da bactéria probiótica *B. lactis*, nos queijos *petit-suisse* estudados.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Regressão	5	0,1376	0,0275	8,1340 *	0,0007
Resíduo	15	0,0507	0,0034		
Falta de ajuste	1	0,0087	0,0087	2,8930	0,1111
Erro puro	14	0,0421	0,0030		
Total	20	0,1883	0,0094		
% variação explicada	73,06%				
% máxima de variação explicável	77,67%				

* Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

Tabela 22. Análise de variância do modelo cúbico especial, ajustado aos dados experimentais do atributo de textura firmeza, nos queijos *petit-suisse* estudados.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Regressão	5	5,0188	1,0038	119,7693*	0,0000
Resíduo	15	0,1257	0,0084		
Falta de ajuste	1	0,0085	0,0085	1,0084	0,3323
Erro puro	14	0,1173	0,0084		
Total	20	5,1445	0,2572		
% variação explicada	97,56%				
% máxima de variação explicável	97,72%				

* Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

Tabela 23. Análise de variância do modelo cúbico especial, ajustado aos dados experimentais do conteúdo de frutanos, nos queijos *petit-suisse* estudados.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Regressão	5	181,2734	36,2547	9407,8580*	0,0000
Resíduo	15	0,0578	0,0039		
Falta de ajuste	1	0,0022	0,0022	0,5490	0,4709
Erro puro	14	0,0556	0,0040		
Total	20	181,3312	9,0666		
% variação explicada	99,97%				
% máxima de variação explicável	99,97%				

* Significante ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$)

De acordo com BARROS NETO *et al.* (2003), para que uma regressão não seja simplesmente estatisticamente significativa, mas também seja útil para o propósito preditivo, o valor da relação entre o quadrado médio da regressão, dividido pelo quadrado médio do resíduo (F encontrado), deve ser, pelo menos, quatro ou cinco vezes o valor do F tabelado. Assim, observa-se que esta condição foi aceita para o modelo cúbico especial aplicado aos resultados de conteúdo de frutanos e firmeza, com $(F_{5,15})$ tabelado = 2,9, podendo ser usado como modelo preditivo. Entretanto, nos modelos para os resultados de viabilidade de *L. acidophilus* e *B. lactis*, esse critério não foi atingido, isto é, os modelos para os probióticos poderiam não ser preditivos o suficiente, e apenas com experimentos de validação dos modelos foi possível se verificar a preditividade dos mesmos.

As equações canônicas de Scheffé para três componentes (CORNELL, 2002) foram ajustadas aos resultados experimentais obtidos, de acordo com a equação a seguir:

$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$, onde: $b_1, b_2, \dots$ são os coeficientes da regressão e x_1, x_2, x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente ($\sum_{i=1}^q x_i = 1, 1 \geq x_i \geq 0$), e $\hat{y}$ é a estimativa de resposta. Os números entre parênteses colocados abaixo dos coeficientes nas equações representam o erro-padrão de cada coeficiente estimado.

Equação para *L. acidophilus*:

$$\hat{y}_{(1)} = 6,60x_1 + 6,67x_2 + 6,50x_3 - 0,31x_1x_2 + 0,39x_2x_3 - 4,55x_1x_2x_3,$$

$$(\pm 0,03) \quad (\pm 0,03) \quad (\pm 0,03) \quad (\pm 0,13) \quad (\pm 0,13) \quad (\pm 0,88)$$

onde $\hat{y}_{(1)}$ é a contagem estimada da bactéria probiótica *L. acidophilus*.

Equação para *B. lactis*:

$$\hat{y}_{(2)} = 7,40x_1 + 7,40x_2 + 7,26x_3 - 0,36x_1x_3 - 0,50x_2x_3 + 3,30x_1x_2x_3,$$

$$(\pm 0,03) \quad (\pm 0,03) \quad (\pm 0,03) \quad (\pm 0,16) \quad (\pm 0,16) \quad (\pm 1,08)$$

onde $\hat{y}_{(2)}$ é a contagem estimada da bactéria probiótica *B. lactis*.

Equação para firmeza:

$$\hat{y}_{(3)} = 2,37x_1 + 3,79x_2 + 2,32x_3 - 1,07x_1x_2 + 0,65x_1x_3 - 9,41x_1x_2x_3,$$

(±0,05) (±0,05) (±0,05) (±0,26) (±0,26) (±1,70)

onde $\hat{y}_{(3)}$ é o valor estimado do parâmetro de textura instrumental firmeza.

Equação para conteúdo de frutanos:

$$\hat{y}_{(4)} = 9,01x_1 + 9,05x_2 + 0,45x_3 + 0,98x_1x_3 + 0,52x_2x_3 + 5,29x_1x_2x_3,$$

(±0,03) (±0,03) (±0,04) (±0,17) (±0,17) (±1,16)

onde $\hat{y}_{(4)}$ é o valor estimado do conteúdo de frutanos.

Equação para o custo:

$$\hat{y}_{(5)} = 2,74x_1 + 2,20x_2 + 2,74x_3, \text{ onde } \hat{y}_{(5)} \text{ é o custo estimado.}$$

Os modelos estatísticos estimados para a viabilidade de *L. acidophilus* e *B. lactis*, para o parâmetro de textura instrumental firmeza, para o conteúdo de frutanos e para o custo estão representados nas Figuras 14 a 18, na forma de diagramas triangulares, onde são indicadas as curvas de nível (linhas ligando pontos de resposta de igual valor). Os três vértices correspondem às respostas dos fatores oligofrutose, inulina e mel. Os pontos sobre os lados do triângulo equilátero representam os resultados das misturas binárias. Na região interna, encontram-se as respostas referentes às misturas ternárias. Os diagramas triangulares são úteis por mostrarem todas as possíveis combinações entre os ingredientes avaliados as quais possam resultar na mesma resposta. Assim, qualquer resposta pode ser estimada pela substituição dos valores proporcionais de oligofrutose, inulina e mel nas equações, sem a necessidade de ensaios adicionais. De acordo com CASTRO *et al.* (2000), isso significa flexibilidade e competitividade do produto final, sem alterações na sua qualidade.

Figura 14. Diagrama triangular para a variável-resposta *L. acidophilus* (log ufc g⁻¹) aos 21 dias de armazenamento dos queijos *petit-suisse* estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

Figura 15. Diagrama triangular para a variável-resposta *B. lactis* (log ufc g⁻¹) aos 21 dias de armazenamento dos queijos *petit-suisse* estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

Conforme pode ser verificado por estes diagramas (figuras 14 e 15), o efeito antagônico pode ser visualizado pelas depressões nas curvas dos diagramas. Onde há uma depressão mais acentuada, menor será a contagem bacteriana. O comportamento estimado para cada probiótico é diferente. As populações de *B. lactis* aumentarão se a proporção de mel for menor, ao passo que as de *L. acidophilus* sofrerão menor influência do mel.

Figura 16. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta firmeza (N) aos 21 dias de armazenamento dos queijos *petit-suisse* estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

Para a firmeza (figura 16), a área de depressão é mais acentuada, demonstrando a região que apresenta maior firmeza como aquela próxima ao vértice de x_2 (maior concentração de inulina).

Figura 17. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta conteúdo de frutanos (%) aos 21 dias de armazenamento dos queijos *petit-suisse* estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

Quanto ao conteúdo de frutanos, percebe-se que uma grande área apresenta valores iguais ou superiores a 5%, envolvendo principalmente a inulina e a oligofrutose (vértices x_1 e x_2) (figura 17).

Conforme a figura 18, percebe-se nitidamente que o ingrediente prebiótico de mais baixo custo corresponde ao vértice x_2 , com a inulina.

Figura 18. Diagrama triangular ajustado para a variável-resposta custo dos ingredientes prebióticos ($\text{R\$ Kg}^{-1}$) dos queijos *petit-suisse* estudados, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

4.8.2. Validação dos modelos de regressão obtidos

A validação dos modelos de regressão obtidos foi realizada através de três novos ensaios, aleatoriamente escolhidos (tabela 24), dentro da área experimental previamente definida, pois sabe-se que os valores preditivos só serão válidos dentro da faixa experimental.

Os queijos *petit-suisse* foram processados, seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente, e analisados para as variáveis-resposta envolvidas na otimização aos 21 dias de armazenamento. Os resultados analíticos estão apresentados na tabela 25. A comparação entre os valores observados e os estimados pelos modelos está apresentada na tabela 26.

Tabela 24. Proporção dos ingredientes prebióticos adicionados para a realização dos ensaios de validação.

Número do Ensaio	Ingredientes prebióticos		
	x_1 Oligofrutose	x_2 Inulina	x_3 Mel
T9	7/12	3/12	2/12
T10	4/14	9/14	1/14
T11	2/5	3/5	0

Tabela 25. Resultados de viabilidade de *L. acidophilus* e de *B. lactis* média ([desvio padrão] log ufc g⁻¹)*, de firmeza (média [desvio padrão] N)** e de conteúdo de frutanos (% médio [desvio padrão])* dos queijos *petit-suisse* estudados nos ensaios de validação, aos 21 dias de armazenamento.

Ensaio	Variável-resposta			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. lactis</i>	firmeza	conteúdo de frutanos
T9	6,38 [0,06]	7,37 [0,03]	2,42 [0,04]	7,77 [0,01]
T10	6,50 [0,12]	7,36 [0,08]	2,99 [0,01]	8,47 [0,02]
T11	6,47 [0,05]	7,38 [0,06]	2,98 [0,03]	8,97 [0,01]

* n=3; ** n=5

Tabela 26. Comparação entre os valores estimados pelos modelos polinomiais e os valores medidos experimentalmente nos ensaios de validação.

Variável-resposta	Ensaio	Valor estimado*	Valor observado*	P**	Erro relativo (%)
<i>L. acidophilus</i>	T9	6,46	6,38	0,97467	1,26
	T10	6,54	6,50		0,59
	T11	6,57	6,47		1,51
<i>B. lactis</i>	T9	7,40	7,37	0,99999	0,45
	T10	7,40	7,36		0,57
	T11	7,40	7,38		0,29
firmeza	T9	2,40	2,42	0,99999	0,88
	T10	2,97	2,99		0,52
	T11	2,97	2,98		0,51
conteúdo de frutanos	T9	7,84	7,77	0,98058	0,95
	T10	8,54	8,47		0,86
	T11	9,03	8,97		0,71

* Valores expressos por média; ** valores de probabilidade pelo teste de Qui-quadrado.

Os resultados obtidos experimentalmente foram comparados com os resultados estimados, através da aplicação do teste de Qui-quadrado (BOWER, 1998b) e não houve diferença significativa entre eles, sugerindo que os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais.

4.8.3. Otimização empregando o *Software Statistica 7.0*

As funções gerais desenvolvidas por DERRINGER E SUICH (1980), para a otimização simultânea de diferentes variáveis-resposta, baseiam-se na definição das funções de desejabilidade ou conveniência para as respostas, com valores restritos ao intervalo [0,1]. Zero (0) significa um valor inaceitável, enquanto um (1) representa o valor mais desejável. Cada variável-resposta deve possuir uma função de desejabilidade definida.

Após especificar as funções de desejabilidade para todas as variáveis-resposta, deve-se combiná-las numa desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das desejabilidades individuais. Isso faz com que a desejabilidade global se anule sempre que uma das respostas apresentar um valor inaceitável, não importa quão satisfatórios sejam os valores das outras respostas. Assim, a otimização simultânea das variáveis-resposta corresponderia à maximização da desejabilidade global (BARROS NETO *et al.*, 2003).

O objetivo para a otimização, na presente pesquisa, foi combinar os resultados de viabilidade de *L. acidophilus* e *B. lactis*, de firmeza instrumental, de conteúdo de frutanos e dos custos relativos aos ingredientes prebióticos. Adotou-se o modelo cúbico para este último parâmetro apenas com a finalidade de otimização, pois os custos desses ingredientes foram coletados diretamente com os respectivos fornecedores, e, portanto, não havia variação dos mesmos.

A forma da função de desejabilidade de uma dada variável-resposta depende de como o problema está formulado e, muitas vezes, a máxima desejabilidade global não é a condição mais interessante, analisando-se as desejabilidades individuais. Assim, uma situação foi sugerida para a otimização, de acordo com os critérios de custo médio a baixo, conteúdo de frutanos médio a alto, firmeza instrumental média a alta, viabilidade de *B. lactis* uniforme (qualquer valor satisfaria as condições de otimização) e viabilidade de *L. acidophilus* de média a alta. Apenas através do emprego de um programa estatístico que envolva o método da RSM, podem-se associar aspectos não-lineares da representação matemática dos modelos de regressão e permitir uma rápida e satisfatória otimização simultânea (CASTRO *et al.*, 2003).

A tabela 27 mostra a atribuição dos valores na otimização realizada de acordo com os critérios mencionados, empregando o *software Statistica 7.0*.

Tabela 27. Valores atribuídos no procedimento de otimização matemática realizado, empregando o programa Statistica 7.0 (Statsoft).

Valor atribuído na otimização*	Variáveis-resposta estudadas				
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. lactis</i>	firmeza	custos	conteúdo de frutanos
Baixo	0	1	0	1	0
Médio	1	1	1	1	1
Alto	1	1	0,5	0	1

* peso relativo para valores baixos, médios e altos na escolha da desejabilidade, variando de 0 a 1.

De acordo com a tabela 27, quando se deseja valorizar mais um determinado resultado, pontua-se com o número 1 no critério de otimização (por exemplo: contagem de *L. acidophilus* elevada). Por outro lado, quando não se deseja determinado resultado, pontua-se com o número 0.

Há algumas possibilidades de otimização que se encaixam nas diferentes condições selecionadas e o pesquisador deve valorizar de forma diferente as respostas, a fim de obter a otimização adequada. Como já comentara ARTEAGA *et al.* (1994), é importante se ter em mente que o termo ‘melhor’ pode ter diferentes significados para diferentes produtos. A melhor mistura, assim, pode ser aquela menos cara ou que apresente certas restrições. A seguir, a figura de desejabilidade e valores preditivos (figura 19) mostra a opção escolhida nesta pesquisa.

A figura 19 apresenta o comportamento de cada variável, conforme sua concentração aumenta (eixo x), na primeira linha para *L. acidophilus*, na segunda para *B. lactis* e assim, sucessivamente, para firmeza, custos e conteúdo de frutanos. A faixa contendo os resultados otimizados está representada pelas linhas horizontais azuis. Os traços verdes representam a evolução dos resultados preditivos de desejabilidade conforme a proporção de cada ingrediente aumenta, da esquerda para a direita. A linha pontilhada vertical vermelha corresponde às proporções de cada variável na mistura ótima obtida. A desejabilidade global é observada na última linha de gráficos, através da linha pontilhada horizontal azul. A última coluna apresenta os gráficos com os perfis de desejabilidade das respostas, definidos de acordo com os valores escolhidos para os limites e os respectivos expoentes (tabela 27).

Obteve-se a mistura ótima contendo 25% de oligofrutose, 70% de inulina e 5% de mel e desejabilidade global de 99,55%. Essa mistura engloba todos os critérios atribuídos previamente, especialmente aqueles necessários para o queijo *petit-suisse* enquadrar-se como potencialmente probiótico - viabilidade dos probióticos superior a $6 \log \text{ufc g}^{-1}$ e prebiótico – mínimo de 4 a 5 % (desde que com uma ingestão diária mínima de 100g do produto). A inclusão do custo dos ingredientes prebióticos parece-nos fundamental, quando se trata de desenvolver um alimento funcional, que, provavelmente, possua o custo encarecido diante da adição do ingrediente extra, gerando preocupação em termos mercadológicos.

Figura 19. Perfis para valores preditivos e desejabilidade para as variáveis otimizadas e desejabilidade global, onde x_1 , x_2 , x_3 são os fatores oligofrutose, inulina e mel, respectivamente.

Considera-se, assim, que a aplicação da RSM para misturas pode ser de grande utilidade para se otimizarem as variáveis-resposta avaliadas, identificando a proporção dos componentes que resultará no melhor produto, de acordo com os critérios pré-estabelecidos, e torna-se ferramenta preciosa no desenvolvimento de misturas como os alimentos funcionais, os quais são sistemas biológicos complexos.

5. CONCLUSÕES

- Todos os ensaios de queijo *petit-suisse* desenvolvidos apresentaram populações dos microrganismos probióticos *Bifidobacterium lactis* BL04 e *Lactobacillus acidophilus* Lac4 acima do mínimo recomendado em literatura, para promover efeitos fisiológicos benéficos à saúde humana, tendo variado de 7,20 a 7,69 log ufc g⁻¹ e de 6,08 a 6,99 log ufc g⁻¹, para *B. lactis* e *L. acidophilus*, respectivamente.
- Os ensaios não diferiram significativamente quanto à aceitabilidade sensorial com painel de consumidores ($p < 0,05$), exceto aos 28 dias de armazenamento, sendo que os ensaios contendo oligofrutose (T1) e oligofrutose mais inulina (T4) foram os mais bem aceitos, enquanto o ensaio-controle (T8), o menos aceito. Todos os resultados ficaram entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.
- A aceitabilidade foi crescente ao longo do tempo de armazenamento refrigerado, significativamente ($p < 0,05$) apenas para alguns ensaios (T1, T2 e T4), justamente aqueles que continham misturas puras de oligofrutose e inulina e sua combinação. Os atributos mais citados pelos consumidores, quanto a sua preferência, foram o sabor - mais preferido nos ensaios T1 (oligofrutose), T3 (mel) e T5 (oligofrutose mais mel) e menos preferido no ensaio T8 (controle), e a textura - sempre menos preferida devido à presença de ‘arenosidade’.
- Todas as combinações dos ensaios estudadas, exceto o T3, podem ser consideradas prebióticas, partindo-se da recomendação de 4 a 5 g dia⁻¹ de frutanos e com uma porção diária de 100g de queijo *petit-suisse*.
- O perfil de textura instrumental auxiliou na avaliação da qualidade do queijo *petit-suisse*. O ingrediente que mais afetou a textura instrumental foi a inulina, fornecendo produtos mais firmes, mais coesos e com adesividade e gomosidade maiores. Oligofrutose e mel, como ingredientes únicos,

produziram queijo *petit-suisse* com menor firmeza, adesividade e gomosidade, parâmetros estes afetados negativamente pelo pH nos diferentes produtos estudados, ao contrário do que ocorreu com a coesividade.

- A aplicação da Metodologia da Superfície de Resposta, com base nos parâmetros selecionados (viabilidade de probióticos, firmeza instrumental, teor de frutanos e custo), seguida de otimização, resultou na mistura ótima contendo 25% de oligofrutose, 70% de inulina e 5% de mel e desejabilidade global de 99,55%.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento do queijo *petit-suisse* simbiótico envolve, além da parte tecnológica, a avaliação da efetividade de ação dos ingredientes estudados. Para tanto, outros trabalhos poderão dar continuidade a esta pesquisa, enfocando testes sensoriais e ensaios biológicos, para, então, o produto estar pronto para ser conduzido a uma possível comercialização.

Já estão em andamento dois projetos estudando outras combinações de probióticos em queijo *petit-suisse*, conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, e, possivelmente, outras alterações tecnológicas venham a ser estudadas, envolvendo os aspectos funcionais, os de textura, substituição de gordura e novos sabores.

Os seguintes trabalhos resultaram das atividades realizadas durante o doutorado:

ARAGÓN-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*, 2006. Disponível em: www.sciencedirect.com. [no prelo]

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo *petit-suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, 2006.

CARDARELLI, H. R.; MARUYAMA, L. Y.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Sensory acceptance of different formulations of synbiotic petit-suisse cheese In: THE 6th PANGBORN SYMPOSIUM, 2005, Harrogate. *THE 6th PANGBORN SYMPOSIUM*. Oxford: Elsevier, 2005. v.6. p.101.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.; CARDARELLI, H.R.; ARAGON, D.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Musse de chocolate probiótico e simbiótico. In: XIX Ciência e Tecnologia de Alimentos: estratégia para o desenvolvimento, Recife, 2004. *Resumos*. Recife. XIX CBCTA, 2004. 1 CD.

CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Avaliação da viabilidade de *Bifidobacterium longum* em queijo "petit-suisse" probiótico utilizando diferentes meios de cultura In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. *XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

CARDARELLI, H.R.; FEBBO, C. de; 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*, São Paulo, v.39, supl.3, p.147-149, 2003.

CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Avaliação microbiológica de diferentes formulações de queijo *petit-suisse* probiótico durante o armazenamento refrigerado. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 5, Campinas, 2003. *Resumos*. Campinas. UNICAMP, 2003. 1 CD.

Paralelamente, um estágio por mim realizado na Universidade de Reading, na Inglaterra, possibilitou a execução dos experimentos na área de fermentação *in vitro*, usando sistemas de cultura em batelada, no laboratório chefiado pelo Prof. Glenn Gibson e sob a supervisão da pesquisadora Jelena Vulevic, pertencente à equipe. O emprego do modelo *in vitro* permitiu a avaliação indireta, em organismos humanos, do efeito simbiótico do queijo *petit-suisse* desenvolvido nesta pesquisa. Simulou-se o processo que ocorre no intestino grosso desses organismos, através das análises dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos, da assimilação dos carboidratos, e da modificação da microbiota (pelo método da hibridização fluorescente *in situ*). O referido trabalho está na fase de redação de um artigo científico a ser publicado em colaboração com os pesquisadores citados:

CARDARELLI, H.R.; VULEVIC, J.; SAAD, S.M.I.; GIBSON, G.R. Application of the measure of prebiotic effect (MPE) for determining the *in vitro* prebiotic potential of different *petit-suisse* cheese formulations. - em fase de redação, para ser submetido à publicação em periódico internacional em setembro de 2006.

Outros trabalhos resultantes desta pesquisa, envolvendo a avaliação sensorial e a otimização pela metodologia da superfície de resposta, serão também brevemente submetidos à publicação, destacando-se os seguintes:

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of a potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. – submetido à publicação no periódico internacional Food Chemistry - Elsevier em julho de 2006.

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Optimization of prebiotics in *petit-suisse* cheese by the response surface methodology for mixtures. - em fase de redação, para ser submetido à publicação em periódico internacional em setembro de 2006.

Outros artigos não relacionados ao tema da Tese de Doutorado:

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream-cheeses. *Journal of Food Protection*. [in press].

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ACNIELSEN GLOBAL SERVICES. Os produtos mais quentes do mundo: informações sobre o crescimento de categorias de alimentos e bebidas em 2004. 2004. 39p. [Relatório Executivo de Notícias]. Disponível em: http://www.acnielsen.com.br/publicacoes/alimentos_e_bebidas_2004.pdf. Acesso em: 5 maio 2006.

ADHIKARI, K.; HEYMANN, H.; HUFF, H.E. Textural characteristics of lowfat, fullfat and smoked cheeses: sensory and instrumental approaches. *Food Quality and Preference*, v.14, p.211-218, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 15 dez. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n.18, de 19 de abril de 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm. Acesso em: 25 fev. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Probióticos [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por cinthiahoch@yahoo.com.br em 17 de fev. de 2006.

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

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, v.12, p.201-208, 2002.

ALBUQUERQUE, L. C. *Queijos no Brasil*. Juiz de Fora: EPAMIG – ILCT, 1986. 139p.

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

ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados ou em co-cultura em queijo minas frescal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.38, supl.1, p.61, 2002. Res.ALN42. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, São Paulo, 2002).

ANTONIOU, K.D.; PETRIDIS, D.; RAPHAELIDIS, S.; OMAR, Z.B.; KESTELOOT, R. Texture assessment of french cheeses. *Journal of Food Science*, v.65, n.1, p.168-172, 2000.

ARAGÓN-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*, 2006. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 9 maio 2006.

ARTEAGA, G.E.; LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; COFRADES, S.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Ingredient interaction effects on protein functionality: mixture design approach. *Journal of Food Science*, v.58, p.656-662, 1993.

ARTEAGA, G.E.; LI-CHAN, E.; VAZQUEZ-ARTEAGA, M.C.; NAKAI, S. Systematic experimental designs for product formula optimization. *Trends in Food Science and Technology*, v.5, p.243-254, 1994.

ARUNACHALAM, K.D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, v.19, n.10, p.1559-1597, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. *Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimentos sob inspeção federal*. São Paulo. 2004 [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por hrcarda@terra.com.br em 9 maio de 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 17.ed. Gaithersburg, 2003. v.1, p.12.1-12.3; v.2, p.33.1-33.88.

BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; HENNI, D.E.; TORNADIJO, M.E; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, v.2, n.3, p.343-349, 2004.

BALLONGUE, J.; GRILL, J.P.; BARATTE-EULOGE, P. Effects of *Bifidobacterium* fermented milks on human intestinal flora. *Lait*, v.73, p.249-256, 1993.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como Fazer Ensaio: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2 ed., Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 401p.

BENEDITO, J.; GONZÁLEZ, R.; ROSSELLO, C.; MULET, A. Instrumental and expert assessment of Mahon cheese texture. *Journal of Food Science*, v.65, n.7, p.1170-1174, 2000.

BERNET-CAMARD, M.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance (s) active *in vitro* and *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.7, p.2747-2753, 1997.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.273-277, 2003.

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

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

BLAY, G.M.; MICHEL, C.D.; BLOTTIÈRE, H.M.; CHERBUT, C.J. Raw potato starch and short-chain fructooligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.312-320, 2003.

BOECKENER, L.S.; SCHNEPF, M.I.; TUNGLAND, B.C. Inulin: a review of nutritional and health implications. *Advances in Food and Nutrition Research*, v.43, p.1-63, 2001.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. *Nutrition and Food Science*, v. 28, n.2, p.102-108, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). *Nutrition and Food Science*, v. 28, n.1, p.41-48, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science - VI: correlation and regression (part B). *Nutrition and Food Science*, v. 30, n.2, p.80-85, 2000.

BOWER, J.A. Statistics for food science III: sensory evaluation data. Part B – discrimination tests. *Nutr. Food Sci.*, v. 26, n.2, p.16-22, 1996.

BOWER, J.A. Statistics for food science IV: two sample tests. *Nutr. Food Sci.*, v. 27, n.1, p.39-43, 1997.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p.

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.

BRASIL. Instrução Normativa n.53, de 29 de dezembro de 2000. O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura e do Abastecimento dispõe o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo *petit-suisse*. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1774>. Acesso em: 15 maio 2006.

BRASIL. Portaria n.146, de 7 de março de 1996. O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento dispõe o regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijo. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/>. Acesso em: 15 maio 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. O Ministério de Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, tipo B, tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. Assim como, o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/>. Acesso em: 15 maio 2002.

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

BREUIL, P.; MUELLENET, J.F. A comparison of three instrumental tests for predicting sensory texture profiles of cheese. *Journal of Texture Studies*, v.32, p.41-55, 2001.

BRUNO, F.A.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. In skim milk containing prebiotics. *Journal Food Science*, v.67, n.7, p.2740-2744, 2002.

BRYANT, A.; USTUNOL, Z.; STEFFE, J. Texture of cheddar cheese as influenced by fat reduction. *Journal Food Science*, v.60, n.6, p.1216-1221, 1995.

BURITI, F.C.A. *Viabilidade de obtenção de queijo fresco cremoso simbiótico*. São Paulo, 2005. 75p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BURITI, F.C.A.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Perfil de textura e avaliação sensorial de queijo Minas frescal processado com a adição de uma co-cultura probiótica. In: *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.37, suppl.1, p.41, 2001. res. ALN41. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 6, São Paulo, 2001).

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

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, v.88, suppl.1, p.165-176, 2002.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. São Paulo: Artmed, 2003. 255p.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. *Food Research International*, v.39, n.2, p.203-211, 2006.

CARDARELLI, H.R.; FEBBO, C. de; 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, suppl.3, p.147-149, 2003.

CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Avaliação microbiológica de diferentes formulações de queijo *petit-suisse* probiótico durante o armazenamento refrigerado. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 5, Campinas, 2003. *Resumos*. Campinas. UNICAMP, 2003. 1 CD.

CARDELLO, A.V.; SCHUTZ, H.G.; SNOW, C.; LESHER, L. Predictors of food acceptance, consumption and satisfaction in specific eating situations. *Food Quality and Preference*, v.11, n.3, p.201-216, 2000.

CARVALHO, M.A.M. de; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENESES, E.W. *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud – Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2001, p.77-89.

CASTRO, I.A.; SILVA, R.S.F.; TIRAPEGUI, J.; BORSATO, D.; BONA, E. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation: constrained simplex method approach. *International Journal of Food Science and Technology*, v.38, p.103-110, 2003.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R.S.F. Development of protein mixtures and evaluation of their sensory properties using the statistical response surface methodology. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v.49, p.453-461, 1998.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R.S.F. Protein mixtures and their nutritional properties optimized by response surface methodology. *Nutrition Research*, v.20, p.1341-1353, 2000.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl. 1, p.159-162, 2002.

CHICK, H.; SHIN, H.S.; USTUNOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *Journal of Food Science*, v.66, n.3, p.478-481, 2001.

COCONNIER, M.H.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F.; HUDAULT, S.; SERVIN, A.L. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, n.5, p.1046-1052, 1997.

COCONNIER, M.H.; SERVIN, A.L. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, v.17, n.5, p.741-754, 2003.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, v.8, p.487-490, 1998.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.69, suppl., p.1052-1057, 1999.

CORNELL, J.A. *Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data*. 3 ed. New York: John Wiley e Sons, 2002. 649p.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*, v.129, n.7, suppl., p.1412S-1417S, 1999.

CRITTENDEN, R.G. Prebiotics. In: TANNOCK, G.W., ed. *Probiotics: a critical review*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1999. p.141-156.

CUMMINGS, J.H.; MacFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl., p.145-151, 2002.

CUMMINGS, J.H.; MacFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2, suppl., p.415S-420S, 2001.

CUMMINGS, J.H.; ROBERFROID, M.B.; ANDERSSON, H.; BARTH, C.; FERRO-LUZZI, A.; GHOOS, Y.; GIBNEY, M.; HERMONSEN, K.; JAMES, W.P.T.; KORVER, O.; LAIRON, D.; PASCAL, G.; VORAGEN, A.G.S. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.51, p.417-423, 1997.

DAIGLE, A.O.; ROY, D.O.; BÉLANGER, G.O.; VUILLEMARD, J.C. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.6, p.1081-1091, 1999.

DARUKARADHYA, J.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from cheddar cheese. *International Dairy Journal*, v.16, p.439-445, 2006.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DeFELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R e D. *Trends in Food Science and Technology*, v.6, n.2. p.59-61, 1995.

DEGUCHI, Y.; MORISHITA, T.; MUTAI, M. Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.49, p.13-19, 1985.

DELLO STAFFOLO, M.; BERTOLA, N.; MARTINO, M.; BEVILACQUA, A. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, v.14, p.263-268, 2004.

DELZENNE, N.M.; DAUBIOUL, C.; NEYRINCK, M.; LASA, M. TAPER, H.S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, v.87 (suppl. 2), p.S255-S259, 2002.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality and Technology*, v.12, p.214-219, 1980.

DESAI, A.R.; POWELL, I.B.; SHAH, N.P. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*, v.69, n.3, p.M57-M60, 2004.

DEVEREUX, H.M.; JONES, G.P.; MCCORMICK, L.; HUNTER, W.C. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. *Journal of Food Science*, v.68, n.5, p.1850-1854, 2003.

DROUAULT, S.; ANBA, J.; CORTHIER, G. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.2, p.938-941, 2002.

DUNCAN, S.H.; SCOTT, K.P.; RAMSAY, A.G.; HARMSSEN, H.J.M.; WELLING, G.W.; STEWART, C.S.; FLINT H.J. Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.2, p.1136-1142, 2003.

DUTCOVSKY, S.D. Análise Sensorial de Alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.

ELLEGÅRD, L.; ANDERSSON, H.; BOSAEUS, I. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.51, p.105, 1997.

ELLEKJÆR, M.R.; NAES, T.; BAARDSETH, P. Milk proteins affect yield and sensory quality of cooked sausages. *Journal of Food Science*, v.61, p.660-666, 1996.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICA, 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.

FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, n.3, p.449-455, 2003.

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

FLAMM, G.; GLINSMANN, W.; KRITCHEVSKY, D.; PROSKY, L.; ROBERFROID, M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.41, p.353-362, 2001.

FOEGEDING, E.A.; BROWN, J.; DRAKE, M.; DAUBERT, C.R. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, v.13, p.585-591, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. Acesso em: 30 maio 2006. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; E GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, v.9, p.53-61, 1999.

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

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl.2, p.287-291, 2002.

FRANCK, J.F.; HASSAN, A.N. Starter cultures and their use. In: MARTH, E.H.; STEEL, J.L., eds. *Applied dairy microbiology*. New York: Marcel Decker, 2001. p.131-172.

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

GARDINER, G.E.; BOUCHIER, P.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P.; STANTON, C. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, v.12, p.749-756, 2002.

GARRO, M.S.; AGUIRRE, L.; GIORI, G.S. Biological activity of *Bifidobacterium longum* in response to environmental pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.70, n.5, p.612-617, 2005.

GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotic inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.129, p.1438-1441, 1999.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, v.130, suppl., p.391-394, 2000.

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

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.

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L.; eds. *Applied Dairy Microbiology*, New York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.377-381, 1985.

GLICKSMAN, M. Food Hydrocolloids. Boca Raton: CRC Press, 1986. 230 p.

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 and Technology*, v.10, p.139-157, 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.6, p.1492-1507, 1998.

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

GONZÁLEZ, V.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura instrumental de queijo tipo minas frescal. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.34, n.2, p.109-113, 1998.

GUARINO, A.; CANANI, R.B.; SPAGNUOLO, M.I.; ALBANO, F.; BENEDETTO, L.D. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.25, p.516-519, 1998.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.360, p.512-518, 2003.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, v.37, p.839-850, 2004.

GUILLOU, A.A.; FLOROS, J.D. Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage. *Journal of Food Science*, v.58, p.1381-1389, 1993.

GUINARD, J.X.; ZOUMAS-MORSE, C.; MORI, L.; UATONI, B.; PANYAM, D.; KILARA, A. Sugar and fat effects on sensory properties of ice cream. *Journal of Food Science*, v.62, p.1087-1094, 1997.

GUNASEKARAN, S.; AK, M.M. Cheese texture. In: GUNASEKARAN, S.; AK, M.M. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press: Boca Raton. 2003. p. 299-329.

GUNGERICH, C.; JANSEN, J. Procedure for installing a hazard analysis critical point system using quark manufacture as an example. *Deutsche Milchwirtschaft*, v.45, n.22, p.1084-1090, 1994 apud MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Ultrafiltração do leite para produção de queijo tipo *petit-suisse*. *Indústria de Laticínios*, v.2, n.13, p.35-44, 1998.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT: Food Science and Technology*, v.37, p.461-466, 2004.

HEIKKILA, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, n.3, p.471-478, 2003.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, v.14, p.957-965, 2004.

HELLER, K.J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR; deVRESE, M. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of Fermented Functional Foods*. Boca Raton: CRC, 2003. p.203-225.

HERSLETH, M.; UELAND, O.; ALLAIN, H.; NAES, T. Consumer acceptance of cheese, influence of different testing conditions. *Food Quality and Preference*, v.16, n.2, p.103-110, 2005.

Hinkelmann, K., & Kempthorne, O. *Design and analysis of experiments*. New York: John Wiley & Sons, 1994. vol. 1. p.290-296.

HOEBREGS, H. Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative estudy. *Journal of AOAC International*, v.80, n.5, p.1029-1036, 1997.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. *Technology of cheesemaking*. Boca Raton: CRC, 1999. p.99-131.

HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; BERNARD DECARIS, B.; ALEXANDER BOLOTIN, A.; CHRISTINE DELORME, C.; EHRLICH, D.; GUÉDON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiological Reviews*, v.29, p.435-463, 2005.

HOLT, S.D.; RESSURECCION, A.V.A.; McWATTERS, K.H. Formulation, evaluation and optimization of tortillas containing wheat, cowpea and peanut flours using mixture response surface methodology. *Journal of Food Science*, v.57, p.121-127, 1992.

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

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

HOYOS, A.B. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *International Journal of Infect. Dis.*, v.3, n.4, p.197-202, 1999.

HUSSON-KAO, C.; MENGAUD, J.; GRIPON, J.C.; BENBADIS, L.; CHAPOT-CHARTIER, M.P. Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v.55, p.209-213, 2000.

IGARASHI, M.; IIYAMA, Y.; KATO, R.; TOMITA, M.; ASAMI, N.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strength of bone in ovariectomised osteoporosis model rats. *Bifidus*, v.7, p.139-147, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus – culture media*. 1995. 36p. [BULLETIN OF THE IDF 306].

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

JAHREIS, G.; VOGELSANG, H.; KIESSLING, G.; SCHUBERT, R.; BUNTE, C.; HAMMES, W.P. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Research International*, v.35, p.133-138, 2002.

JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, v.86, p.263-267, 2004.

JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 6.ed. Gaithersburg: Aspen, 2000. 679p.

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

JELEN, P.; RENZ-SCHAUEN, A. Quarg manufacturing innovations and their effects on quality, nutritive value and consumer acceptance. *Food Technology*, v.43, p.75-81, 1989.

JUNQUEIRA, R.M.; CASTRO, I.A.; ARÊAS, J.A.G.; SILVA, A.C.C.; SCHOLZ, M.B.S.; MENDES, S.; OLIVEIRA, K.C. Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour. *Food Chemistry*, 2006. Disponível em www.sciencedirect.com. Acesso em 11 maio 2006.

JURKIEWICZ, C.H. Avaliação das características microbiológicas, físico-químicas, e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*. São Paulo, 1999. 134p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an *in vitro* comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Protection*, v.65, n.1, p.214-218, 2002.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.6, p.2682-2684, 2000.

KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F.K.; MØLLER, P.L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Reserach International*, v.36, p.1037-1046, 2003.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v.15, p.1-9, 2002.

KELLY, A.L.; O'DONNELL, H.J.O. Composition, gel properties and microstructure of quarg as affected by processing parameters and milk quality. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 295-301, 1998.

KIP, P., MEYER, D., JELLEMA, R.H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 2005. Disponível em www.sciencedirect.com. Acesso em: 9 maio 2006.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2.ed. Washington: ASM, 2001. p. 797-811.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*, v.89, p.597-606, 2003.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, v.14, p.365-373, 2004.

KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, supp.2, p.S193-S197, 2002.

KONUKLAR, G.; INGLETT, G.E.; WARNER, K.; CARRIERE, C.J. Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hydrocolloids*, v.18, p.535-545, 2004.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *Journal of America Dietetic Association*, v.101, p.229-241, 2001.

KOSIKOWSKI, F. Bakers', nefchatel and cream cheese. In: KOSIKOWSKI, F.. *Cheese and fermented milk foods*. 2.ed. New York: F.V. Kosikowski and associates, 1978. p.144-167.

KÖSTER, E.P. The psychology of food choice: some often encountered fallacies. *Food Quality and Preference*, v.14, n.5-6, p.359-373, 2003.

KÖSTER, E.P.; COURONNE, T.; LEÓN, F.; LÉVY, C.; MARCELINO, A.S. Repeatability in hedonic sensory measurement: a conceptual exploration. *Food Quality and Preference*, v.14, n.2, p.165-176, 2002.

KOZLOWSKA, K.; JERUSZKA, M.; MATUSZEWSKA, L.; ROSZKOWSKI, W.; BARYLKO-PIKIELNA, N.; BRZOZOWSKA, A. Hedonic tests in different locations as predictors of apple juice consumption at home in elderly and young subjects. *Food Quality and Preference*, v.14, n.8, p.653-661, 2003.

KROGER, M. The manufacture of quarg cheese. *Cultured Dairy Production Journal*, v. 15, n. 3, p. 11-14, 1980.

KWAK, N.S.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, v.12, p.99-107, 2001.

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

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

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

LEITE, J.M.C.; TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; DE MARIA, C.A.B. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry*, v.70, p.93-98, 2000.

LIU, Q.; DUAN, Z.P.; HA, D.K.; BENGMARK, S.; KURTOVIC, J.; RIORDAN, S.M. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, v.39, n.5, p.1441-1449, 2004.

LOBO, A.R.; FILISETTI, T.M.C.C. Bone mineral parameters in growing rats fed fructooligosaccharides. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.39 (supl.2), p.67, 2003a.

LOBO, A.R.; FILISETTI, T.M.C.C. Yacon (*Polymnia sonchifolia*) flour containing fructooligosaccharides and its effects on bone mineral density and gastrointestinal parameters in growing rats. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.39 (supl.3), p.36, 2003b.

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

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*, v.37, p.805-814, 2004.

MACFIE, H.J.H.; HEDDERLEY, D. Current practice in relating sensory perception to instrumental measurements. *Food Quality and Preference*, v.4, n.1, p.41-49, 1993.

MAKRAS, L.; VAN ACKER, G.; DE VUYST, L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.11, p.6531-6537, 2005.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M.C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl.2, p.153-157, 2002.

MÅRTENSSON, O.; ÖSTE, R.; HOLST, O. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria on oat-based, non-dairy products. *Food Research International*, v.35, p.775-784, 2002.

MARTÍN-DIANA, A.B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.13, p.827-833, 2003.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; R. GOMEZ. Raffinose family of oligosaccharides from lupin seeds as prebiotics: application in dairy products. *Journal of Food Protection*, v.68, p.1246-1252, 2005.

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. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, 2006.

MATER, D.D.G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M.J.; MOGENET, A.; BRESSON, J.L.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiological Letters*, v. 250, p.185-187, 2005.

MATTILA-SANDHOLM, T.; BLUM, S.; COLLINS, J.K.; CRITTENDEN, R.; DE VOS, W.; DUNNE, C.; FONDÉN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, L.; OUWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; von WRIGHT, A. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science and Technology*, v.10, p.393-399, 1999.

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

MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G.. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*, v.14, p.611-618, 2004.

MEIDANI, S.N.; HA, W.K. Immunologic effects of yoghurt. *American Journal Clinical Nutrition*, v.71, p.861-872, 2000.

MENNE, E.; GUGGENBUHL, N.; ROBERFROID, M. Fn-type chicory inulin hidrolysate has a prebiotic effect in humans. *Journal of Nutrition*, v.130, p.1197-1199, 2000.

MESSENS, W.; VAN de WALLE, D.; AREVALO, J.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese *International Dairy Journal*, v.10, p.359-367, 2000.

MEYER, D.; TUNGLAND, B. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: their physiological effects and health implications. In: MCCLARY, B.V.; PROSKY, L. *Advanced dietary fibre technology*. New York: Marston Book Services, 2001. cap.39, p.455-470.

MITAL, B.K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Critical Review Microbiology*, v.21, n.3, p.175-214, 1995.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, v.5, n.1, p. 2-9, 1996.

MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Diferença tecnológica comparativa na fabricação de queijo tipo quark obtido pelo método de ultrafiltração direta do leite em comparação com o processo tradicional. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.47, n.279/281, p.104-108, 1992a.

MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Características físico-químicas do queijo tipo petit-suisse obtido pelo processo de ultrafiltração do leite padronizado parcialmente acidificado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.47, n.279/281, p.139-144, 1992b.

MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Determinação do pH ideal de acidificação do leite para produção de queijo tipo petit-suisse pelo método de ultrafiltração do leite padronizado, parcialmente acidificado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.47, n.279/281, p.144-147, 1992c.

MORGADO, F.E.F.; BRANDÃO, S.C.C. Ultrafiltração do leite para produção de queijo tipo *petit-suisse*. *Indústria de Laticínios*, v.2, n.13, p.35-44, 1998.

MORTON, R.F.; HEBEL, J.R.; McCARTER, R.J. A study guide to epidemiology and biostatistics. Aspen: Gaithersburg, p.89-98, 1996 apud BOWER, J.A. Statistics for food science - VI: correlation and regression (part B). *Nutrition and Food Science*, v.30, n.2, p.80-85, 2000.

MOSHFEGH, A.J.; FRIDAY, J.E.; COUSSEMENT, P. Presence of inulin, and oligofructose in the diets of Americans. *Journal of Nutrition*, v.129, p.1407, 1999.

MOURA, L.N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.66-69, 2001.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, v.97, n.1, p.1-8, 2004.

MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*, v.85, n.1, suppl. 1, p. 47-53, 2001.

NATIONAL HONEY BOARD. Honey information kit of the food and beverage industries. Longmont: National Honey Board, 1996. Disponível em <http://www.nhb.org/>. Acesso em: 20 maio 2002.

NEWMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, Ribeirão Preto, v.31, p.1565-1573, 1998.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition*, v.129, p.1402S-1406S, 1999.

NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.100, n.6, p.583-592, 2005.

NYMAN, M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, p.163-168, 2002.

O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Science and Technology*, v.10, p.418-424, 1999.

OKASAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Microbiological profile of probiotic Minas cheese. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. *Resumos*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.389, res.AL-091.

OKSANEN, P.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; HÄMÄLÄINEN, P.; IHANTOLA-VORMISTO, A. MUURASMEMI-ISOVIIITA, L.; NIKKARA, S.; OKSANEN, T.; PÖRSTI, T. SALMINEN, E.; SIITONEN, S.; STUCKEY, H.; TOPPILA, A.; VAPAATALO, H. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. *Ann. Med.*, v.22, p.53-56, 1990.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.11, p.935-942, 2001.

OMAR, B. Z; RAPHAELIDES, S.; KESTELOOT, R. Texture Evaluation on French Acid-Type Fresh Cheeses. *Journal of Texture Studies*, v.26, n.3, p.325-338. 1995.

ORAFITI. *Raftiline and raftilose*. Oreye, s.n.t. [folder]

ÖZER, D.; AKIN, S.; ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International*, v.11, n.1, p.19-24, 2005.

PASTOR, M.V.; COSTELL, E.; IZQUIERDO, L.; DURÁN, L. Optimising acceptability of a high fruit low sugar peach nectar using aspartame and guar gum. *Journal Food Science*, v.61, p.852-855, 1996.

PENNACHIA, C.; VAUGHAN, E.E.; VILLANI, F. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. *Meat Science*, v.73, p.90-101, 2006.

PERDIGÓN, G.; VINTIÑI, E.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.82, n.6, p.1108-1114, 1999.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemical Molecular Biology*, v.37, n.4, p.259-281, 2002.

POOL-ZOBEL, B.L.; MÜNZNER, R.; HOLZAPFEL, W.H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. *Nutrition and Cancer*, v.20, p.261-270, 1993a.

POOL-ZOBEL, B.L.; BERTRAM, B.; KNOLL, M.; LAMBERTZ, R.; NEUDECKER, C.; SCHILLINGER, U.; SCHMEZER, P.; HOLZAPFEL, W.H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastro-intestinal tract of rats. *Nutrition and Cancer*, v.20, p.271-280, 1993b.

POOL-ZOBEL, B.L.; VAN LOO, J. ROWLAND, I. ROBERFROID, M.B. Experimental evidences on the potencial of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *British Journal of Nutrition*, v.87, p.273-281, 2002.

POPPER, R.; ROSENSTOCK, W.; SCHRAIDT, M.; KROLL, B.J. The effect of attribute questions on overall liking ratings. *Food Quality and Preference*, v.15, n.7-8, p.853-858, 2004.

PRINYAWIWATKUL, W.; McWATTERS, K.H.; BEUCHAT, L.R.; PHILLIPS, R.D. Optimizing acceptability of chicken nuggets containing fermented cowpea and peanut flours. *Journal of Food Science*, v.62, p.889-905, 1997.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science and Technology*, v.13, p.3-11, 2002.

RAO, A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effect. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl., p.1442S, 1999.

RAO, V.A. The properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research*, v.21, p.843-848, 2001.

RASIC, J.L.; VUJICIC, I.F.; SKRINJAR, M.; VULIC, M. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnology Letters*, v.14, p.39-44, 1992.

RASTALL, R.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.490-496, 2002.

RASTALL, R.A.; FULLER, R.; GASKINS, H.R.; GIBSON, G.R. Colonic functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. *Functional foods: concept to product*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2000. cap.4, p.71-95.

RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, H.S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R., POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiological Ecology*, v.52, p.145-152, 2005.

REDDY, B.S.; RIVENSON, A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo (4, 5-f) quinoline, a food mutagen. *Cancer Research*, v.53, p.3914-3918, 1993.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, suppl., p.437S-443S, 2001.

REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.37, n.2, p.105-118, 2003.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1398-1401, 1999.

ROBERFROID, M.B. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*, v.16, n.7/8, p.677-679, 2000a.

ROBERFROID, M.B. Defining functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. *Functional foods: concept to product*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2000b. cap.1, p.9-27.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestion and Liver Disease*, v.34, suppl.2, p.105-110, 2002a.

ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v. 87, suppl. 2, p. 139-143, 2002b.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, v.93, n.1, p. 13-25, 2005.

ROBERFROID, M.B., VAN LOO, J.A.E., GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.128, p.11-19, 1998.

ROBERFROID, M.B.; DELZENNE, N.M. Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition*, v.18, p.117-143, 1998.

ROBINSON, R.K. The potential of inulin – a functional ingredient. *British Food Journal*, v.97, p.30-32, 1995.

ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, v.95, p.77-82, 2006.

ROHM, H. Consumer awareness of food texture in Austria. *Journal of Texture Studies*, v.21, p.363-373, 1990.

ROSENTHAL, A.J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In: ROSENTHAL, A.J., ed. *Food texture: measurement and perception*. Gaithersburg: Aspen, 1999. p.1-17.

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. *Food Australia*, v.49, n.10, p.471-475, 1997.

RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.50, n.2, p.51-57, 1995.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, n.1, 2006 [no prelo].

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.197-215, 2000.

SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet*, v.344, p.1046-1049, 1994.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, p.93-106, 1998.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *S. aureus* in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, n.1, p.1-7, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.319-331, 2001.

SANDRAZ, M.H. Fromage Frais: le bénéfice de l'innovation. *Revue Laitière Française*, v.486, p.26-30, 1989.

SCHALLER-POVOLNY, L.A.; SMITH, D.E. Sensory attributes and storage life of reduced fat ice cream as related to inulin content. *Journal of Food Science*, v.64, n.3, p.555-559, 1999.

SCHIFFRIN, E.J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J.M.; DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v.78, p.491-497, 1994.

SCHLEY, P.D.; FIELD, C.J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, v.87 (suppl.2), p.S221-S230, 2002.

SCHMIDT, K. A.; SMITH, D. E. Rheological Properties of Gum and Milk Protein Interactions. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.36-42, 1992.

SCHNEEMAN, B.O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *Journal of Nutrition*, v.129, suppl.7, p.1424S-1427S, 1999.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHAAFSMA, G.; VAN DER HEUVEL, E.G.H.M.; SCHREZENMEIER, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73 (suppl.), p.459-464, 2001.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHREZENMEIER, J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism. *British Journal of Nutrition*, v.87 (suppl.2), p.S179-S186, 2002.

SCHREZENMEIER, J.; de VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2 (S), p.361-364S, 2001.

SEBASTIANI, H.; ZELGER, G. Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, v.53, n.1, p.15-19, 1998.

SHAH, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, v.55, n.11, p.46-53, 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. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. In yogurt. *International Dairy Journal*, v.7, p.349-356, 1997.

SHAMALA, T.R.; SHRI JYOTHI, S.; SAIBABA, P. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Letters in Applied Microbiology*, v.30, p.453-455, 2000.

SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.10, p.401-408, 2000.

SHIN, H.S.; LEE, J.H.; PETSKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skin milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science*, v.65, n.5, p.884-887, 2000.

SHOEMAKER, C. F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A. C. Rheological Characterization of Dairy Products. *Food Technology*, v. 46, p.98-104, 1992.

SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 11, p.327-345, 2001.

SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V.H.; SCHMITT, D.F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*, v.48, n.1, p.85-89, 1994.

STONE, H.; SIDEL, J. *Sensory evaluation practices*. New York: Academic Press, 1993.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. *Probiotics: a critical review*. Wymondham: Horizon Scientific, 1999. p.57-64.

SZCZESNIAK, A.S. Correlating sensory with instrumental texture measurements – an overview of recent developments. *Journal of Texture Studies*, v.18, p.1-15, 1987.

SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling historical and scientific perspectives. *Food Technology*, v.52, n.8, p.54-57, 1998.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, v.13, p.215-255, 2002.

TAHIRI, M.; TRESSOL, J.C.; ARNOULD, J.; BORNET, F.R.J.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; FEILLET-COUDRAY, C.; DUCROS, V.; PÉPIN, D.; BROUNS, F.; ROUSSEL, A.; RAYSSIGUIER, Y.; COUDRAY, C. Five-week intake of short-chain fructooligosaccharides increase intestinal absorption and status of magnesium in postmenopausal women. *Journal of Bone Mineralisation Research*, v.16, n.11, p.2152-2160, 2001.

TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D.; SHENANA, M.E.; KALAB, M.; DAWOOD, A.H. Produced cheese analogues incorporating fat-substitutes 2. rheology, sensory perception of texture and microstructure. *LWT: Food Science and Technology*, v.32, p.50-59, 1999.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. *International Dairy Journal*, 2005. Disponível em www.sciencedirect.com. Acesso em 15 maio 2006.

TEJADA-SIMON, M.V.; LEE, J.H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ingestion of yogurt containing *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.649-680, 1999.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobaillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.1055-1066, 2004.

TSANGALIS, S.; SHAH, N.P. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, p.541-554, 2004.

TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Non digestible oligo-and-polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, v.1, p.73-92, 2002.

TUOHY, K.M.; FINLAY, R.K.; WYNNE, A.G.; GIBSON, G.R. A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-inulin-Faecal bacteria enumerated using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, v.7, n.3, p.113-118, 2001a.

TUOHY, K.M.; KOLIDA, S.; LUTSTENBERGER, A.; GIBSON, G.R. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolyzed guar gum and fructooligosaccharide – a human volunteer study. *British Journal of Nutrition*, v.86, n.3, p.341-348, 2001b.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, v.8, n.15, p.692-700. 2003.

USTUNOL, Z.; GANDHI, H. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. In honey-sweetened skim milk. *Journal of Food Protection*, v.64, n.11, p.1775-1779, 2001.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.

VAN DENDER, A.G.F. Aspectos tecnológicos da fabricação de queijo tipo *quark*. Disponível em <http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/tecnolat/art02.htm>. Acesso em: 21 nov. 2001.

VAN DENDER, A.G.F.; VALLE, J.L.E.; GARCIA, S.; MORENO, I. Adaptação da tecnologia de fabricação e de termização do queijo quark. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 40, n. 239, p. 33-53, 1985.

VAN DOKKUN, W.; WEZENDOK, B.; SRIKUMAR, T.S.; VAN DEL HEUVEL, E.G. Effect of nondigestible oligosaccharides on large-bowel functions, blood lipid concentrations and glucose absorption in young healthy male subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.53, p.1-7, 1999.

VAN LOO, J.; CAOUSEMENT, P.; DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.35, n.6, p.525-552, 1995.

VEIGA, P.G. Fabricação de queijo *petit-suisse* por ultrafiltração de leite coagulado. Campinas, 1999. 116p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP).

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, n.3, p.349-357, 2000.

VEIGA, P.G.; VIOTTO, W.K. The influence of heat treatment on the composition water holding capacity and acceptance of *petit-suisse* cheese produced by the ultrafiltration of coagulated milk. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.3, p.83-90, 2000.

VERBEKE, W. Functional foods: consumer willingness to compromise on taste for health. *Food Quality and Preference*, v.17, n.1-2, p.126-131, 2006.

VESA, T. H.; MARTEAU, P.; ZIDI, S.; POCHART, P.; RAMBAUD, J.C. Digestion and tolerance of lactose from yogurt and different semi-solid fermented dairy products containing *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in lactose maldigesters. Is bacterial lactase important? *European Journal of Clinical Nutrition*, v.50, p.730-733, 1996.

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

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

VRESE, M. de; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2, suppl., p.421-429, 2001.

WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, v.9, p.668-675, 1998.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. New York: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WILDMAN, R.E.C. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2001.

YAMAZAKI, S.; TSUYUKI, S.; AKASHIBA, H.; KAMIMURA, H.; KIMURA, M.; KAWASHIMA, T.; UEDA, K. Immune response of *Bifidobacterium*-monoassociated mice. *Bifidobacteria Microflora*, Tokyo, v.10, p.19-31, 1991.

YASUI, H.; OHWAKI, M. Enhancement of immune response in PEYERS patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.1187-1195, 1991.

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

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, v.8, p.473-479, 1998.

ZISU, B.; SHAH, N.P. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p.3405–3415, 2003.

ANEXO 1 – Modelo da ficha aplicada à avaliação sensorial

Ficha para teste de escala hedônica – Aceitabilidade geral

Nome: _____ Data: ____/____/____

AMOSTRA: _____

Avalie a amostra e circule o número na escala abaixo que indica 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 de que você **mais** gostou na amostra:

☺ _____

Cite o atributo de que você **menos** gostou na amostra:

☹ _____

ANEXO 2 – Modelo da ficha utilizada para recrutamento dos participantes da avaliação sensorial**Recrutamento de provadores para análise sensorial de queijo “petit-suisse”**

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

O produto a ser avaliado apresenta os seguintes ingredientes:

Leite desnatado pasteurizado, fermento láctico, coagulante, cloreto de cálcio, açúcar, creme de leite, gelatina, goma xantana, polpa de morango, frutano, mel, corante natural carmim de cochonilha, aroma natural idêntico de morango.

O produto foi elaborado e acondicionado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Estima-se o tempo das análises de, no máximo, 10 minutos. Ao final das análises os provadores receberão um brinde, mas não haverá remuneração financeira.

Portanto, se você costuma consumir este tipo de produto, tem entre 18 e 60 anos e quiser participar dessa análise, por favor, leia o Termo de Compromisso abaixo e preencha as informações a seguir

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

ANEXO 3 - Ofício da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas aprovando a realização da avaliação sensorial

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 96

São Paulo, 06 de agosto de 2003.

**Ilmo(a) Sr(a).
Haíssa Roberta Cardarelli**

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 04 de agosto passado, **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento de Queijo Petit-Suisse Simbiótico" (Protocolo nº 197) apresentado por Vossa Senhoria.

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

Atenciosamente,

Profª. Drª. Valentina Porta
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Susana Marta Isay Saad
FBT

ANEXO 4 – Informações para os Membros das Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará, na ata (relatório de defesa), a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Prof.^a Dr.^a Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP